

**Die fetale Gehirnentwicklung nach moderater
mütterlicher Nahrungsrestriktion zum Zeitpunkt 0.5 der
Gestation beim Primaten**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Kristina Stuchlik
geboren am 7. April 1983 in Zeitz

Gutachter

- 1. Prof. Dr. med. Matthias Schwab, Jena**
- 2. PD Dr. med. Axel Hübler, Jena**
- 3. Prof. Dr. med. Rüdiger Seitz, Düsseldorf**

Datum der öffentlichen Verteidigung: 06.10.2009

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom
BDNF	neurotropher Faktor des ZNS
BMP2/4	Knochen morphogenetisches Protein 2/4
CNTF	Ziliärer neurotropher Faktor
COS	Fibroblasten von <i>Cercopithecus aethiops</i> (<i>Grüne Meerkatze</i>) mit Defekt SV-40
FAO	Nahrungs- und Wirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FGF 2	Fibroblasten- Wachstumsfaktor 2
GFAP	saures Gliafaserprotein
GLUT1	Glukosetransportprotein 1
GLUT3	Glukosetransportprotein 3
HE	Hämatoxylin und Eosin
HHN- Achse	Hypothalamus- Hypophysen- Nebennierenrinden- Achse
ICD-10	Internationale Klassifikation von Krankheiten
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IGFBP	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor - Bindungsprotein
IR	Immunoreaktivität
MAP1B	Mikrotubuli- assoziiertes Protein 1b
MAP2a,b	Mikrotubuli- assoziiertes Protein 2ab
Mrd	Milliarden
mRNA	Messenger- Ribonukleinsäure
NeuN	Neuron-spezifisches nukleäres Antigen
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
Tab	Tabelle
TUNEL	Terminale Desoxyribosyl-Transferase vermittelte dUTP Nick End Färbung
UNICEF	Kinderhilfswerk der Vereinten Nationen
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
1. Zusammenfassung	7
2. Einleitung	9
2.1 Gesundheitspolitische Bedeutung von mütterlicher Nahrungsrestriktion	9
2.2 Ursachen von Mangelernährung in Entwicklungsländern	10
2.3 Ursachen von Mangelernährung in entwickelten Ländern	11
2.4 Ablauf der normalen Hirnentwicklung	12
2.4.1 Makroskopische Entwicklung der einzelnen Hirnstrukturen.....	12
2.4.2 Neurogenese.....	12
2.4.3 Gliogenese.....	13
2.5 Effekte von Mangelernährung auf die Entwicklung wesentlicher Hirnstrukturen ..	14
2.6 Effekte von Mangelernährung auf die Entwicklung der Hirnfunktion	16
3. Zielstellung	18
4. Material und Methoden	21
4.1 Versuchsablauf.....	21
4.2 Gewinnung der fetalen Gehirne	23
4.3 Herstellung der histologischen Präparate.....	24
4.4 Histochemische und Immunhistochemische Untersuchungen.....	24
4.4.1 Darstellung der Hirnstrukturen	24
4.4.2 Zellproliferation und programmierter Zelltod.....	25
4.4.3 Neuronale Reifung	26
4.4.4 Gliale Reifung	27
4.4.5 Entwicklung des neuronalen Netzwerkes	27
4.4.6 Myelinisierung	28
4.4.7 Glukokortikoidrezeptoren	28
4.4.8 Neuronale Zytoskelettproteine	29
4.4.9 Glukosetransportproteine 1 und 3	29
4.5 Quantifizierung der untersuchten Parameter.....	29
4.5.1 Untersuchte Hirnregionen	29
4.5.2 Quantifizierung der strukturellen, zellulären und subzellulären Veränderungen	29

4.5.2.1 Morphometrie der Hirnstruktur.....	30
4.5.2.2 Quantifizierung von Zellproliferation und Zelltod	30
4.5.2.3 Quantifizierung von neuronaler und glialer Reifung, Glukokortikoidrezeptoren, neuronalen Zytoskelettproteinen und Glukosetransportproteinen	31
4.5.2.4 Quantifizierung von neuronaler Arborisierung und Myelinisierung	32
4.6 Statistische Auswertung	32
5. Ergebnisse.....	33
5.1 Stand der Hirnentwicklung zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer	33
5.1.1 Subventrikulärzone	34
5.1.2 Intermediärzone	34
5.1.3 Kortikale Platte	34
5.2 Effekte mütterlicher Nahrungsrestriktion auf das Wachstum.....	35
5.3 Effekte mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Hirnentwicklung	36
5.3.1 Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Morphologie des Gehirns....	36
5.3.2 Zellproliferation und programmierter Zelltod.....	37
5.3.3 Neuronale Reifung	40
5.3.4 Gliale Reifung	42
5.3.5 Entwicklung des neuronalen Netzwerkes	45
5.3.6 Myelinisierung	46
5.3.7 Glukokortikoidrezeptoren	47
5.3.8 Neuronale Zytoskelettproteine	48
5.3.9 Glukosetransportproteine 1 und 3	50
6. Diskussion.....	55
6.1. Methodische Betrachtungen.....	55
6.1.1 Unterernährungsmodell.....	55
6.1.2 Verwendete histochemische und immunhistochemische Färbungen.....	57
6.1.3 Quantifizierung der Färbungen	62
6.2. Stand der Hirnentwicklung zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer.....	63
6.3. Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion.....	68
6.3.1 Erzielte Unterernährung	68
6.3.2 Effekte auf die Morphologie des Gehirns	70
6.3.3 Effekte auf die Proliferation und Apoptose	71
6.3.4 Effekte auf die neuronale und gliale Reifung	73

6.3.5	Effekte auf die Migration	74
6.3.6	Effekte auf die Arborisierung	74
6.3.7	Effekte auf die Myelinisierung	75
6.3.8	Effekte auf die Glukokortikoidrezeptoren	76
6.3.9	Effekte auf die neuronalen Zytoskelettproteine	77
6.3.10	Effekte auf die Glukosetransportproteine 1 und 3	77
6.4	Potentielle Ursachen für die Effekte der mütterlichen Nahrungsrestriktion.....	78
6.4.1	Wachstumsfaktoren.....	78
6.4.2	Chronischer pränataler Stress.....	79
7.	Schlussfolgerung	83
8.	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	i
9.	Anhang.....	xix
9.1	Lebenslauf	xix
9.2.	Ehrenwörtliche Erklärung	xx
9.3.	Danksagung.....	xxi

1. Zusammenfassung

Weltweit leiden 35% bis 40% der Kinder unter moderater Mangelernährung (UNICEF 2001), welche zu einer beeinträchtigten kognitiven Entwicklung und persistierenden intellektuellen Defiziten und Aufmerksamkeitsstörungen bis ins Erwachsenenalter hinein führen kann (Olness 2003). Die Entwicklung des zentralen Nervensystems, seine Plastizität und der hohe Energiebedarf während der Ontogenese (über die Hälfte der Energie wird während der Entwicklung für neurogiale Wachstums- und Formationsprozesse des Säugetiergehirns verwendet (Gibbons 1998)), macht das Gehirn vulnerabel für ungünstige intrauterine Bedingungen. Die gesundheitspolitische Bedeutung von moderater mütterlicher Mangelernährung spielt nicht nur in Entwicklungsländern eine wichtige Rolle, sondern auch in entwickelten Ländern, in denen sich sozial benachteiligte Schichten häufig mit lipidreichen und vitaminarmen Nahrungsmitteln ernähren. Obwohl Studien bei Ratten zeigen, dass mütterliche Nahrungsrestriktion strukturelle Veränderungen des sich entwickelnden und des erwachsenen Gehirns, sowie Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit und von Neurotransmittersystemen hervorruft, gibt es kaum Untersuchungen beim Primaten.

Ich habe deshalb die Effekte von 30%iger globaler mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die frühe Reifung des fetalen Primatengehirns untersucht, weil die direkte Übertragbarkeit von bei Ratten gewonnenen Ergebnissen auf die Hirnentwicklung des Menschen problematisch ist, da sich das Rattengehirn hauptsächlich postnatal entwickelt. Trächtige Paviane wurden entweder *ad libitum* (n=8) oder mit 70% der *ad libitum* Diät (n=6) ab dem 30. Tag der Trächtigkeit gefüttert. Zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationszeit wurde im fetalen Gehirn der Einfluss von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Zellproliferation (anti-Ki67), den programmierten Zelltod (TUNEL) und die neuronale und gliale Differenzierung anhand der Immunoreaktivität (IR) der unreifen und reifen Astrozyten (S-100 β , GFAP) und Neuronen (Doublecortin, NeuN), sowie der Verzweigungsgrad der Astrozyten, die Myelinisierung und die Ausprägung des neuronalen Netzwerkes untersucht. Der Einfluss von mütterlicher Nahrungsrestriktion wurde außerdem auf die zytoskelettalen Proteine MAP1B und MAP2a,b, die wesentlich in die zerebrale Morphogenese involviert sind, und das Glukosetransportprotein (GLUT) 1, das limitierend für die Glukoseaufnahme in das Gehirn ist, sowie GLUT3, durch das der Glukosetransport durch die neuronale Membran erfolgt, untersucht. Außerdem wurde die Zahl der Glukokortikoidrezeptoren bestimmt, um mögliche durch die mütterliche Nahrungsrestriktion induzierte Stresseffekte zu quantifizieren. Diese

Untersuchungen fanden in der proliferativ aktiven Subventrikulärzone, der Intermediärzone, durch die die Zellen von der Subventrikulärzone in die Zielregionen wandern, und der kortikalen Platte, als den prospektiven Neokortex und einer der Hauptzielregionen von migrierenden Zellen, des fetalen Primatengehirns statt.

In der Subventrikulärzone fanden sich besonders radiale Gliazellen, als Leitstrukturen für migrierende Neurone, sowie unreife Astrozyten und neuronale Vorläuferzellen. Reife Neurone fanden sich hauptsächlich in der kortikalen Platte. Mütterliche Nahrungsrestriktion reduzierte die Breite der Subventrikulärzone ($p < 0.05$), was zu einer Erhöhung der Zelldichte in dieser Zone führte. Ursache für die erhöhte Zelldichte in der Subventrikulärzone ist möglicherweise eine Störung der extrazellulären Matrix. Nach mütterlicher Nahrungsrestriktion war die Zahl der apoptotischen Zellen erhöht ($p < 0.05$), jedoch blieben die Zahl proliferierender Zellen unbeeinträchtigt. Damit nahm das Verhältnis von Apoptose zu Zellproliferation tendenziell zu ($p < 0.1$). Die Zahl der unreifen Astrozyten nahm in der Subventrikulärzone nach mütterlicher Nahrungsrestriktion ab ($p < 0.05$). Im Kontrast dazu änderte sich die Zahl der reifen Gliazellen, sowie der reifen und unreifen Neuronen nicht. Im prospektiven Neokortex führte mütterliche Nahrungsrestriktion zu einer Verzögerung der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes und der beginnenden Myelinisierung ($p < 0.05$). Die neuronalen Zytoskelettproteine, sowie die GLUT1 und 3 wurden durch mütterliche Nahrungsrestriktion nicht beeinflusst. Die Zahl der Glukokortikoidrezeptoren nahm in der Intermediärzone nach mütterlicher Nahrungsrestriktion zu ($p < 0.05$).

Damit wird die Reifung des Gehirns auf der Ebene des proliferativen Zelltodes und der Entwicklung des kortikalen neuronalen Netzwerkes selbst durch eine moderate mütterliche Nahrungsrestriktion beeinträchtigt. Ursache dieser Veränderungen ist wahrscheinlich eine spezifische Hemmung von IGF-I, welche in diesen Feten nachgewiesen wurde. Weitere mögliche Ursachen für die Hirnentwicklungsstörung sind die verminderte Expression von S-100 β , als eine neurotrophe Substanz, und eine Störung der Funktion der fetalen Stressachse, da Kortisol essentiell für die Reifung des ZNS ist. Eine Störung des neuronalen Zytoskeletts oder der Glukoseaufnahme in das Gehirn spielt keine Rolle für die hier gezeigten Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion.

Nach unserem Wissen ist dies die erste Studie, die den Einfluss von kontrollierter mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die fetale Gehirnentwicklung während der frühen Gestation bei nicht-humanen Primaten untersucht. Folgestudien sind nötig, um das Potenzial dieser Feten zum Aufholen der gezeigten Veränderungen und die funktionellen Folgen der nachgewiesenen Hirnentwicklungsstörungen zu untersuchen.

2. Einleitung

2.1 Gesundheitspolitische Bedeutung von mütterlicher Nahrungsrestriktion

852 Millionen Menschen in der Welt hungern, das sind mehr als die Bevölkerung der USA, Kanada, Europa und Japan zusammen (FAO 2004). Davon leben 815 Millionen Menschen in Entwicklungsländern, während in den Schwellen- und Industrieländern nur wenige Menschen an Hunger leiden (FAO 2004). Es sterben mehr Kinder an den Folgen von Hunger und Unterernährung als an AIDS, Malaria und Tuberkulose zusammen (Müller & Krawinkel 2005).

Der durchschnittliche Energiebedarf eines Menschen im Alter von 25-50 Jahren beträgt 1900-2400 kcal/Tag (Deutsche Gesellschaft für Ernährung 2000). Laut Definition der Vereinten Nationen hungert ein Mensch, wenn er weniger zu essen hat, als er täglich benötigt, um sein Körpergewicht zu erhalten und zugleich leichte Arbeit zu verrichten (weniger als ca. 1800-1900 kcal/Tag, FAO 1985). Bei weniger als etwa 1400 kcal/Tag spricht man von extremer Unterernährung, da diese Menge durchschnittlich benötigt wird, um Stoffwechsel- und Organfunktionen aufrecht zu erhalten, ohne körperliche Leistungen erbringen zu können (FAO 1985). Mangelernährung ist die Bezeichnung für eine ungenügende oder falsch zusammengesetzte Ernährung (Zetkin & Schaldach 1992). Sie lässt sich zum einen in Unterernährung (quantitative Mangelernährung), wie sie häufig in Entwicklungsländern vorkommt, und zum anderen in Fehlernährung (qualitative Mangelernährung), die sowohl in Entwicklungs-, als auch in Industrieländern vorkommt, einteilen (Zetkin & Schaldach 1992). An moderater Mangelernährung leiden 35% bis 40% der Kinder weltweit (UNICEF 2001). Moderate Mangelernährung wird laut der ICD-10 Klassifikation definiert als ein Body-Mass-Index von 18,5- 20,5 kg/m² bei reduziertem Allgemeinzustand oder Gewichtsverlust von mehr als 5% in 2 Monaten oder Nahrungsaufnahme von ca. 25-70% der normalen Nahrungsaufnahme der letzten Woche (Graubner 2007).

Frühe Mangelernährung, z.B. während der Fetalzeit, wie sie häufig in Entwicklungsländern auftritt, hat bleibende Effekte bis ins Erwachsenenalter und führt zu einem höheren Risiko von Fettleibigkeit, kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus (Sawaya et al. 2004, Delisle 2002). Dieses wird durch die sog. „thrifty phenotype“ - Hypothese bestätigt, die besagt, dass es bei unzureichenden fetalen Bedingungen zu einer Anpassung des Metabolismus im Körper kommt, um diese Bedingungen zu überleben (McMillen & Robinson 2005). Insbesondere sind 3 Organsysteme besonders für eine Mangelernährung

vulnerabel: das kardiovaskuläre System, das endokrine System und das ZNS (McMillen & Robinson 2005). Besonders die hohe Plastizität und der hohe Energiebedarf des fetalen Gehirns während der Entwicklung macht es sensitiv für negative intrauterine Bedingungen. Mütterliche Mangelernährung führt zu einer verminderten Expression von Wachstumshormonen und einem Anstieg von mütterlichen Stresshormonen, die in die fetale Zirkulation übergehen können (Schwab 2007). Dies führt zu einer Modulierung der strukturellen und funktionellen Hirnentwicklung und hat außerdem programmierende Effekte auf das fetale Gehirn (Schwab 2007). Bereits eine einmalige Gabe von Glukokortikoiden während der Hirnentwicklung führte zu akuten, aber auch zu dauerhaften Effekten auf das Gehirn (Schwab 2007). Die Auswirkungen einer fetalen Programmierung sind bisher vor allem auf das ZNS wenig untersucht worden, obwohl sie bis in das Erwachsenenalter hinein von Bedeutung sind (Schwab 2007).

2.2 Ursachen von Mangelernährung in Entwicklungsländern

Bei insgesamt ca. 2,2 Mrd. Kindern auf der Welt, leben 1,9 Mrd. Kinder in Entwicklungsländern, die vor allem von Mangelernährung betroffen sind (UNICEF 2005). Mangelernährung liegen viele komplexe Ursachen zu Grunde: Unfaire Wettbewerbsbedingungen im Weltagrarhandel, fehlende Eigentums- und Nutzungsrechte für den Boden, schlechte politische und wirtschaftliche Rahmenbedingungen, eine zunehmende Umweltzerstörung oder die mangelnde Förderung der ländlichen Entwicklung sind einige der Ursachen für Mangelernährung in Entwicklungsländern (Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung 2003). Dies führt zu dauerhafter, strukturell bedingter Armut, die wiederum Nahrungsmangel zur Folge hat (Müller & Krawinkel 2005). Armut ist untrennbar mit Hunger und Mangelernährung verbunden, wobei oft ein Kreislauf entsteht, der nur durch Hilfe von außen zu durchbrechen ist (Müller & Krawinkel 2005). Auch die Gesundheit der Bevölkerung selbst ist für die Ernährungssituation von Bedeutung. Krankheiten, wie HIV oder chronische Diarrhöe, führen zu verminderter Arbeitskraft und zu gesteigertem Nährstoff- und Energiebedarf, der wiederum nicht ausreichend vorhanden ist (Ambrus & Ambrus 2004, Chen & Scimshaw 1983). Die Ernährung vieler Menschen in Entwicklungsländern ist einseitig (Müller & Krawinkel 2005). Sie besteht hauptsächlich aus Reis, Mais, Weizen oder anderen Grundnahrungsmitteln, die zwar genügend Nährstoffe, aber nicht das ganze Spektrum an benötigten Vitaminen und Mineralstoffen enthalten (Diaz et al. 2003). Diese Ursachen einer Mangelernährung unterscheiden sich zwar von den Ursachen

einer Mangelernährung in entwickelten Ländern (siehe Kapitel 2.3.), jedoch sind deren Effekte auf die Hirnentwicklung und Entwicklung von Organsystemen von gleichem Interesse und auch im Hinblick auf die von Mangelernährung betroffene Anzahl von Menschen in Entwicklungsländern, von besonderer Bedeutung.

2.3 Ursachen von Mangelernährung in entwickelten Ländern

Mangelernährung kann während verschiedener Lebensperioden auftreten und hat dementsprechend vielfältige Ursachen. In Industrieländern ist der soziale Druck ein schlankes körperliches Erscheinungsbild zu erreichen sehr hoch, dies führt vor allem bei Jugendlichen zu Mangelernährung (Schneider 2000). Außerdem zeigt sich Fehlernährung durch einen Anstieg von Fettleibigkeit unter Erwachsenen, da die Ernährungsgewohnheiten zu lipidreichen Nahrungsmitteln wechseln und eine Abnahme an körperlicher Aktivität beobachtet wird (Schneider 2000). Oft geht dies mit einer Unterversorgung an Vitaminen und Mineralien einher (WHO 2002). Die Ernährung in Industrienationen besteht zu einem Großteil aus ungesättigten Fettsäuren und wenig Früchten und Gemüse (WHO 2002). Zusammen mit körperlicher Inaktivität und dem Rauchen, ist dies der Hauptgrund von kardiovaskulären Erkrankungen, wie Schlaganfall oder Herzinfarkt, Krebs und Fettleibigkeit im Erwachsenenalter (WHO 2002).

Auch während der Schwangerschaft spielt die Ernährung besonders für die fetale Entwicklung eine bedeutende Rolle. Inadäquate mütterliche Nahrungszufuhr, um z.B. einem bestimmten körperlichen Idealbild zu entsprechen, kann eine Ursache fetaler Mangelernährung sein (Williamson 2006, Schneider 2000). Eine proteinarme, lipidreiche Fehlernährung, wie sie häufig in sozial benachteiligten Schichten vorkommt, da diese Lebensmittel finanziell günstiger sind, stärker beworben werden und damit zum modernen Lebensstil gehören („Fastfood Gesellschaft“), ist besonders während der Schwangerschaft von nachteiliger Bedeutung (Bradley & Corwyn 2002, WHO 2002). Die Nährstoffversorgung des Feten über die Plazenta kann ebenfalls Ursache für eine fetale Mangelernährung sein. Durch plazentare Insuffizienz oder eine Nabelschnurokklusion kann es zu einer mangelnden Versorgung des Feten mit wichtigen Nährstoffen kommen (Edwards et al. 2001, Rees & Harding 2004).

Es ergibt sich hieraus, sowohl für die entwickelten Länder als auch für Entwicklungsländer, eine Vielzahl von möglichen Effekten, die bisher besonders am Gehirn wenig untersucht wurden.

2.4 Ablauf der normalen Hirnentwicklung

2.4.1 Makroskopische Entwicklung der einzelnen Hirnstrukturen

Beim Menschen entsteht am 17. Embryonaltag das Neuroektoderm durch Induktion des Mesoderms und der Chorda dorsalis (Trepel 1999). Aus dem Neuroektoderm entwickelt sich die Neuralplatte, die sich am 18. Embryonaltag zur Neuralrinne vertieft und sich nach unten in Richtung Mesoderm absenkt und schließlich als Neuralrohr zusammenschließt (Trepel 1999). Das Neuralrohr besteht ebenso wie die Neuralleiste aus Neuroepithel, welches sich später zu Neuronen und Gliazellen differenziert (Trepel 1999). Nach dem Schluss des Neuralrohres am 25. Embryonaltag bilden sich im rostralen Abschnitt die sog. Hirnbläschen (Abb. 1, Trepel 1999). Aus der Richtung des Rückenmarks gesehen entsteht das Rhombenzephalon (zukünftige Medulla oblongata, Pons und Zerebellum), danach das Mesenzephalon und schließlich das Prosenzephalon, welches sich am 32. Embryonaltag in zwei telencephale Bläschen sowie das Diencephalon aufgliedert (Abb. 1, Trepel 1999). Aus dem Diencephalonbläschen bildet sich gleichzeitig auf beiden Seiten ein Augenbläschen heraus (spätere Anlage des N. optikus und der Retina) (Trepel 1999).

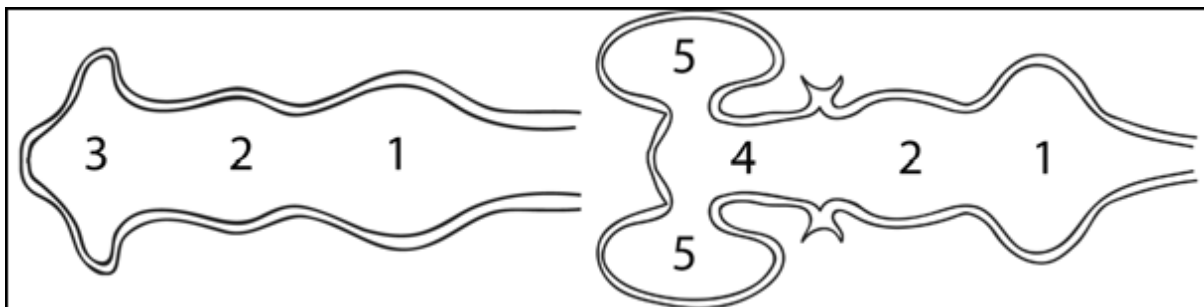


Abb. 1 Entstehung der Gehirnanlagen. Das Gehirn des Menschen geht aus dem rostralen Ende des Neuralrohres hervor, welches sich in 3 Primärbläschen unterteilt: Rhombenzephalonbläschen (1), Mesenzephalonbläschen (2) und Prosenzephalonbläschen (3). Im weiteren Verlauf bilden sich aus dem Prosenzephalonbläschen das Diencephalon (4) sowie die beiden Bläschen des Telencephalons (5). *nach Trepel 1999.*

2.4.2 Neurogenese

Die Wand des Neuralrohres besteht aus drei mikroskopisch abgrenzbaren Zellschichten: eine dem Hohlraum zugewandte, innere Ventrikulärzone (Stratum ependymale), die Zone der Zellproliferation, eine intermediäre (Mantel-)Zone (Stratum palliale) und ganz außen eine

marginale Zone (Stratum marginale) (Trepel 1999). Die neuronalen Vorläuferzellen, die in der ventrikulären Zone aus neuralen Stammzellen entstanden sind (Caviness 1973, Caviness et al. 1995), wandern anhand strahlenförmig ausgerichteter Fasern der radialen Gliazellen in ihre Zielgebiete, z. B. den zerebralen Kortex (Sidman & Rakic 1973). Die neuronale Migration erreicht zur Hälfte der Schwangerschaft ihren Höhepunkt (Rakic 1978). Grundsätzlich entwickeln sich motorische vor sensiblen Neuronen, während sich Interneurone zuletzt entwickeln (Trepel 1999).

Die neuronalen Vorläuferzellen wandern entlang radialer Gliazellen in die frühe Marginalzone ein und spalten diese in einen inneren („subplate“) und einen äußeren („marginal zone“) Anteil auf, während sie selbst die kortikale Platte bilden (Rakic 1971, Rakic 1978). Die Migration der Zellen in der kortikalen Platte erfolgt von innen nach außen, wobei sich die zuletzt ankommenden Zellen von außen an die gebildete Schicht anlagern (Caviness 1973). Hierdurch entstehen zwischen der 8. und 24. Schwangerschaftswoche beim Menschen die sechs Schichten des zerebralen Kortex (Trepel 1999).

2.4.3 Gliogenese

Neurale Stammzellen proliferieren in der Ventrikulärzone durch verschiedene Stimuli zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten (Trepel 1999). Eine Differenzierung in Astrozyten wird z.B. durch das Bone Morphogenetic Protein (BMP2/4) und den Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) erreicht (Rajan & McKay 1998). Die Differenzierung der neuralen Stammzellen zu Oligodendrozyten geschieht durch die Faktoren FGF2 (Fibroblasten- Wachstumsfaktor 2) und das Thyroidhormon T3 (Ben-Hur et al. 1998, Johe et al. 1996). Die Myelinisierung durch Oligodendrozyten beginnt beim Menschen erst unter dem Reiz neuronaler Impulse im 6. Embryonalmonat (Trepel 1999). Dabei werden zumeist die sensiblen vor den motorischen Systemen mit Markscheiden ausgestattet (Trepel 1999). Auch werden weiter kaudale ZNS- Abschnitte früher als rostrale myelinisiert (Rückenmark: 2. Trimenon; Großhirnhemisphären 1-2 Monat postnatal) (Trepel 1999). Die vollständige Myelinisierung ist beim Menschen erst mit dem 2. Lebensjahr abgeschlossen (Brandt 1981).

2.5 Effekte von Mangelernährung auf die Entwicklung wesentlicher Hirnstrukturen

Die Zeitspanne des Gehirnwachstums vor dem zweiten Lebensjahr wird als das kritischste Zeitfenster für Schädigungen durch eine Mangelernährung angesehen, was zu Störungen der emotionalen, motorischen und intellektuellen Entwicklung führen kann (Pollitt 2000). Über die Hälfte der verfügbaren Energie für den sich entwickelnden Organismus wird bei Säugetieren für neurogliale Wachstums- und Formierungsprozesse verbraucht (Gibbons 1998). Die schrittweise Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS), seine Plastizität und der hohe Energiebedarf sind Gründe für die hohe Vulnerabilität des Gehirns bei nachteiligen intrauterinen Bedingungen. Dabei wirkt sich frühe moderate Mangelernährung, z. B. während der Schwangerschaft, negativer auf das Wachstum des Gehirns aus, als starke Mangelernährung in späteren Lebensabschnitten (Winick 1976), da ein großer Teil der Wachstumsprozesse des Gehirns beim Menschen vornehmlich intrauterin stattfinden (Dobbing & Sands 1978). Die Myelinisierung ist vor allem für Mangelernährung während der Proliferation und Reifung der Oligodendrozyten vulnerabel (Wiggins 1986).

Ein Großteil der Erkenntnisse zur Beeinflussung der Hirnstrukturen durch Nahrungsmangel stammen von Ratten, deren Gehirnentwicklung sich postnatal vollzieht (Clancy et al. 2001). Ihr Stand der Hirnentwicklung zur Geburt entspricht etwa dem 7. Schwangerschaftsmonat beim menschlichen Fetus (Clancy et al. 2001, Morgane et al. 1993).

Experimentelle Studien bei Ratten zeigen, dass Nahrungsrestriktion zu strukturellen Veränderungen im Gehirn führt. Bei pränatal während der gesamten Gestation mangelernährten Ratten wurde postnatal am 90. Tag gezeigt, dass es zu einer Abnahme der Neurone im Hippokampus kommt (Lister et al. 2005, Morgane et al. 2002). Resnick et al. zeigten 1979 bei Ratten, dass eine pränatale Mangelernährung während der gesamten Gestation am 90. Tag postnatal zu strukturellen Veränderungen des Bulbus olfaktorius und zu Veränderungen der neuronalen Erregbarkeit führte (Resnick et al. 1979). Es kam zu einer Abnahme des Volumens, sowohl des Bulbus olfaktorius, als auch seiner inneren Granulärzellschicht und zu einer Abnahme der Anzahl von Dendriten (Resnick et al. 1979). Ebenfalls wurde gezeigt, dass eine pränatale Proteinmangelernährung während der ersten 2 Wochen der Gestation, übertragen auf den Menschen entspricht dies der ersten Hälfte der Gestation (Clancy et al. 2001), postnatal zu einer Verminderung der Astrozytenbildung und der Synaptogenese, sowie zu einer Störung der extrazellulären Matrix und neuronalen Differenzierung bei Ratten führen kann (Gressens et al. 1997).

Eine Mangelernährung während der ersten 20 Tage postnatal, übertragen auf den Menschen nach dem 7. Schwangerschaftsmonat (Clancy et al. 2001), führte bei Ratten zu einer Abnahme der Myelinfasern im Nervus Optikus (Wiggins et al. 1984b) und zu einer Abnahme der Gesamtmenge an Myelin im Gehirn (Fuller et al. 1984). Bei postnatal mangelernährten Ratten waren vor allem das Zerebellum, der Hippokampus und der zerebrale Kortex vulnerabel für Mangelernährung, dargestellt durch eine Abnahme der spezifischen Gewichte und zeigten, selbst bei nachfolgender *ad libitum* Fütterung, keine Reversibilität dieser Veränderungen (Fuller & Wiggins 1984). Nichtsdestotrotz wurde den Effekten von mangelnder Nahrungsverfügbarkeit auf die frühe intrauterine Gehirnentwicklung beim Primaten bisher sehr wenig Aufmerksamkeit geschenkt (Winick & Rosso 1969, Cheek et al. 1976, Riopelle et al. 1975, Kerr et al. 1970). Eine Studie zur Untersuchung der Effekte einer Protein- und Kalorienmangelernährung beim Rhesusaffen vom 30. Tag der Gestation bis zum Ende der Gestation zeigte keine signifikanten Unterschiede bei den Protein-, DNA-, RNA-, Cholesterin-, Phospholipid-, Wasser- und Elektrolytkonzentrationen, lediglich eine erhöhte Zink- Konzentration trat bei den Feten nach mütterlicher Kalorienrestriktion von 50% und Proteinrestriktion von 70% auf (Cheek et al. 1976).

Weiterhin existiert eine Studie von Riopelle et al. in der 45 trüchtige Rhesusaffen ebenfalls eine Proteinmangelernährung von 75% des Normalproteins erhielten (Riopelle et al. 1975). Dabei zeigte sich eine Erhöhung fetaler Todesraten bei einer starken Proteinmangelernährung von 75% des Normalproteins, jedoch ergaben sich bei den lebend geborenen Rhesusaffen keine Unterschiede in der totalen Proteinkonzentration und dem Albumin/ Globulin Verhältnis im Blut (Riopelle et al. 1975). Folgestudien zeigten, dass die Jungtiere nach der Geburt die gleichen Futtermengen aufnahmen wie unbehandelte Jungtiere, die Futtervorlieben unbeeinträchtigt blieben, sich keine Unterschiede in Wahrnehmungs- und Lerntests ergaben und das Wachstum nach der Geburt unbeeinträchtigt blieb (Hillman et al. 1974, Hillman & Riopelle 1977, Hillman et al. 1978, Riopelle & Favret 1977).

Kerr et al. untersuchten bei Rhesusaffen die Effekte einer postnatalen globalen Mangelernährung bis zum 7. Lebensmonat (Kerr et al. 1970). Die Rhesusaffen erhielten *ad libitum* Zugang zu einer Milchnahrung, die jeweils spezifisch verdünnt angeboten wurde und es zeigte sich eine erhöhte Futteraufnahme bei diesen Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren, die eine Diät normaler Verdünnung erhielten, jedoch blieb das Wachstum der mangelernährten Tiere deutlich hinter der Kontrollgruppe zurück (Kerr et al. 1970). Nach Fütterung der Normaldiät kam es zu einem Aufholwachstum, auch die Futtermenge normalisierte sich, jedoch wurde in dieser Studie nicht untersucht, inwieweit diese

Mangelernährung die zerebrale Entwicklung beeinflusste (Kerr et al. 1970). Eine Proteinmangelernährung von 75% des Normalproteins im gleichen Zeitraum, veränderte die Futteraufnahme nicht, jedoch war auch hier das Wachstum der Rhesusaffen reduziert, welches bis zum 2. Lebensjahr nicht vollständig aufgeholt wurde (Kerr et al. 1970).

Winick & Rosso zeigten 1969 bei menschlichen Feten bzw. Säuglingen, die im ersten Lebensjahr aufgrund von Mangelernährung gestorben waren, dass es zu einer Abnahme des Gehirngewichtes, sowie der Protein-, RNA und DNA- Gehaltes gekommen ist (Winick & Rosso 1969). Allerdings konnten keine genauen Angaben über die Schwere und Dauer der jeweiligen Mangelernährung gemacht werden (Winick & Rosso 1969). Beim Menschen konnten weiterhin Schädigungen des Gehirngewebes, ein vermindertes Wachstum des Gehirns, sowie eine Reduktion der Myelinisierung, der Anzahl von Synapsen und Neurotransmittern bei Kindern durch schwere Proteinmangelernährung während der Schwangerschaft nachgewiesen werden (Udani 1992). Wobei auch hier keine standardisierte Mangelernährung stattfand bzw. die Stärke der Mangelernährung unterschiedlich war (Udani 1992).

2.6 Effekte von Mangelernährung auf die Entwicklung der Hirnfunktion

Mütterliche Nahrungsrestriktion führt bei Ratten zu einer Beeinflussung der Neurotransmittersysteme und damit auch zu einer Störung der Hirnfunktion selbst (Wiggins et al. 1984a). Während es zu einer Abnahme der cholinergen und GABAergen Übertragung kam, wurde eine Zunahme der katecholaminergen und serotonergen Übertragung bei pränatal mangelernährten Ratten beobachtet (Wiggins et al. 1984a). Mangelernährung führt auch bei Ratten zu Kognitions- und Verhaltensauffälligkeiten im späteren Leben. Durch eine pränatale Proteinmangelernährung von 75% bei Ratten erhöhte sich im späteren Leben impulsives Verhalten, bei vermindertem Angstverhalten (Almeida et al. 1996b). Ebenso kam es bei diesen Ratten zu einer Störung des Sozialverhaltens im späteren Leben, vor allem gezeigt durch eine Abnahme von spielerischem Verhalten und einer Zunahme von antisozialen Verhaltensweisen (Almeida et al. 1996a). Bei postnatal mangelernährten Ratten konnte gezeigt werden, dass eine Proteinmangelernährung von ca. 60% während der Laktation im späteren Leben zu Defiziten im räumlichen Lernvermögen und Gedächtnis führte (Valdares & Almeida 2005).

Beim Menschen führt Mangelernährung während der Schwangerschaft zu einer beeinträchtigten kognitiven Entwicklung und persistierenden intellektuellen Störungen und

Aufmerksamkeitsdefiziten bis hin zum Erwachsenenalter (Olness 2003). Retrospektive klinische Studien beim Menschen haben gezeigt, dass sowohl intrauterine Wachstumsrestriktion, die zu einem niedrigem Geburtsgewicht führte (Hack et al. 2002), als auch Mangelernährung im ersten Lebensjahr (Galler et al. 1984), zu einem niedrigerem Intelligenzquotienten und zu Verhaltens- und Aufmerksamkeitsstörungen im späteren Leben führen kann. Bei schwerer Proteinmangelernährung kann es zu schwerwiegenden neurologischen Beeinträchtigungen, wie z.B. zerebralen Lähmungen, Hydrozephalus, Taubheit und Blindheit kommen (Hack et al. 2002). Weitere Untersuchungen zeigten, dass besonders globaler Nahrungsmangel und eine starke Proteinmangelernährung zur Beeinträchtigung höherer mentaler Funktionen, bis hin zu mentaler Retardierung, führen (Hagberg et al. 1976, Brandt 1981, Olness 2003).

Retrospektive epidemiologische Studien beim Menschen zeigen, dass auch Variationen des Geburtsgewichtes innerhalb der Norm und Beeinträchtigungen des postnatalen Wachstums zu einer Beeinflussung höherer mentaler Funktionen führen, wie die Beeinflussung des verbalen Gedächtnisses und der Ausdrucksfähigkeit im Erwachsenenalter (Richards et al. 2002). Matte et al. zeigten 2001, dass der Intelligenzquotient bei Kindern im Alter von 7 Jahren, unabhängig von postnatalen Einflüssen wie Erziehung oder sozialer Hintergrund, proportional zum Geburtsgewicht, welches innerhalb der Norm lag, abnimmt (Matte et al. 2001). Andere retrospektive epidemiologische Studien zeigten ebenfalls, dass kognitive Fähigkeiten bis in das Erwachsenenalter vom Geburtsgewicht beeinflusst werden (Seidman et al. 1992, Sorensen et al. 1997).

3. Zielstellung

Bisher wurde den Effekten von mangelnder Nahrungsverfügbarkeit auf die frühe intrauterine Gehirnentwicklung sehr wenig Aufmerksamkeit geschenkt, obwohl sich die Grundstrukturen des neuronalen Netzwerkes in dieser Zeit entwickeln (Winick & Rosso 1969, Cheek et al. 1976, Kerr et al. 1970, Riopelle et al. 1975) und Mangelernährung nicht nur in Entwicklungsländern, sondern auch zunehmend in entwickelten Ländern eine Rolle spielt (Schneider 2000, WHO 2002, Ambrus & Ambrus 2004, Chen & Scimshaw 1983).

Experimentelle Studien weisen bei prä- und postnataler Nahrungsrestriktion in Form von einer Proteinmangelernährung oder globalen Mangelernährung auf negative Effekte für die Hirnentwicklung bei Ratten hin (Resnick et al. 1979, Gressens et al. 1997, Fuller & Wiggins 1984, Lister et al. 2005, Morgane et al. 1993 & 2002, Wiggins et al. 1984a), allerdings ist die direkte Übertragbarkeit von an Ratten gewonnenen Daten auf Primaten und den Menschen problematisch. Denn im Gegensatz zum Gehirn des Menschen und von Primaten entwickelt sich das Rattegehirn hauptsächlich nach der Geburt und entspricht nach der Geburt etwa dem Reifegrad des menschlichen Gehirns im 7. Schwangerschaftsmonat (Clancy et al. 2001, Morgane et al. 1993). Außerdem vollzieht sich die Entwicklung des Rattegehirns bei kürzerer Trächtigkeit viel schneller, und führt deshalb zu anderen Auswirkungen von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Hirnentwicklung. Deswegen unterscheidet sich die Empfindlichkeit zwischen Ratten und Primaten auf Umwelteinflüsse potentiell während der fetalen Entwicklung.

Um die Auswirkungen von mütterlicher Nahrungsrestriktion und die Übertragbarkeit der Rattendaten auf den Menschen einschätzen zu können, fehlen aussagekräftige Untersuchungen an Primaten und dies trotz der Bedeutung einer Mangelernährung beim Menschen. Die betroffenen Gehirnstrukturen und Stadien der Gehirnentwicklung, die für Mangelernährung vulnerabel sind, sind noch nicht gut verstanden. Obwohl klar ist, dass die Effekte einer mütterlichen Nahrungsrestriktion vom Zeitpunkt, der Dauer und dem Schweregrad der Mangelernährung abhängig sind (Rees & Harding 2004, Brandt 1981).

Insbesondere fallen die fehlenden Daten zu den Effekten einer moderaten Mangelernährung selbst bei Ratten auf, die auch in entwickelten Ländern eine Rolle spielt. Es gibt zunehmend Hinweise, dass selbst eine moderate mütterliche Mangelernährung zu einer Programmierung von Krankheiten im späteren Leben wie z.B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen und dem metabolischem Syndrom führt (McMillen & Robinson 2005). Über die Effekte einer Mangelernährung auf die Hirnfunktion ist von einigen epidemiologischen retrospektiven

Studien abgesehen, die eine Störung der mentalen Funktion zeigen, sehr wenig bekannt (Hack et al. 2002, Olness 2003, Galler et al. 1984). Noch viel weniger weiß man über die zugrunde liegenden strukturellen Effekte, die zu einer Störung der Hirnfunktion im späteren Leben führen können (Winick 1976, Saugstad 2004).

Ziel der Arbeit ist deshalb die Untersuchung der Effekte von globaler moderater mütterlicher Nahrungsrestriktion (70% der Standarddiät) auf die frühe Gehirnentwicklung bei fetalen nicht- menschlichen Primaten. Als Untersuchungszeitpunkt wurde die Hälfte der Gestationsdauer gewählt, da sich zu diesem Zeitpunkt der Gestation die Grundstrukturen des neuronalen Netzwerkes entwickeln und gleichzeitig die neuronale Proliferation, Migration und Myelinisierung beginnt (Hendrickx & Peterson 1997). So konnten die Effekte einer mütterlichen Nahrungsrestriktion auf wesentliche Stadien der Entwicklung des ZNS untersucht werden. Dabei waren die Auswirkungen der Nahrungsrestriktion entsprechend dem Stand der Hirnentwicklung auf die Zellproliferation und den programmierten Zelltod, die Expression der für die zerebrale Morphogenese wichtigen Strukturproteine, der Reifegrad der Verzweigungen der reifen Astrozyten, die beginnende Myelinisierung und die Entwicklung des neuroglialen Netzwerkes von besonderem Interesse. Ich habe mich auf drei Schlüsselregionen der frühen Gehirnentwicklung konzentriert: die proliferativ aktive Subventrikulärzone, die Intermediärzone, durch die die Zellen von der Subventrikulärzone heraus wandern, und der prospektive Neokortex, einer der Hauptzielregionen von migrierenden Zellen und wesentliche Lokalisation des neuronalen Netzwerkes.

Untersuchungen an Primaten sind in Deutschland aufgrund der notwendigen Haltungsbedingungen schwierig möglich, deshalb wurden die Experimente in den USA bei einem Kooperationspartner (Southwest Foundation of Biomedical Research, San Antonio, USA) durchgeführt. Dazu wurde ein System entwickelt, welches erlaubt die Futteraufnahme in einer kontrollierten Art und Weise zu manipulieren und zu überwachen, wobei die weiblichen Paviane, im Unterschied zur Isolation in individuellen Käfigen, in der Gruppenhaltung belassen wurden und dadurch eine normale soziale und körperliche Aktivität beibehalten (Schlabritz-Loutsevitch et al. 2004a).

Im Einzelnen sollten die Effekte einer globalen mütterlichen Nahrungsrestriktion auf 70% während der ersten Hälfte der Trächtigkeit auf die in Tabelle 1 dargestellten Parameter der Hirnentwicklung durch mich untersucht werden:

	Bedeutung
Immunhistochemische Markierungen	
Ki 67	Darstellung von Zellproliferation (Gerdes et al. 1984b).
Neu N	Darstellung reifer Neurone (Sarnat et al. 1998).
Doublecortin	Spezifische Markierung von migrierenden neuronalen Vorläuferzellen (Couillard-Despres et al. 2005).
GFAP	Darstellung reifer Astrozyten und radialer Gliazellen, welche die Leitstruktur für migrierende Zellen bilden (Rakic 2003).
S-100β	Markierung unreifer Astrozyten (S100β ist zugleich ein neurotropher Faktor) (Burette et al. 1998).
anti-Glucocorticoid-Rezeptor	Darstellung von Glukokortikoidrezeptoren (Sackey et al. 1996), da erhöhte Kortisolwerte eine Bedeutung bei der Vermittlung der Effekte auf die ZNS Entwicklung nach mütterlicher Nahrungsrestriktion haben (McMillen & Robinson 2005).
anti-MAP2a,b und anti-MAP1B	Darstellung von Mikrotubuli- assoziierten Proteinen, welche als Zytoskelettproteine wichtige Funktionen für die Regulation der neuronalen Morphogenese, das Neuritenwachstum und die Stabilisierung von Mikrotubuli erfüllen (Tucker 1990, Johnson & Jope, 1992, Matus 1990).
anti-GLUT1 und GLUT3	Darstellung von Glukosetransportproteinen über die die Glukoseaufnahme in das Gehirn erfolgt, GLUT1, kommt selektiv in Endothelzellen zerebraler Mikrogefäße der Blut- Hirn- Schranke vor und ist für die Glukoseaufnahme in das Gehirn limitierend, GLUT3 kommt in der neuronalen Membran vor (Dick et al. 1984, Gerhart et al. 1989, Maher et al. 1993, Vannucci & Simpson 2003).
Färbungen	
TUNEL <i>in situ</i> Hybridisierung	Darstellung von Apoptose (Gavrieli et al. 1992).
Hämatoxylin und Eosin	Darstellung der morphologischen Entwicklung von Hirnstrukturen.
Silberimprägnation	Darstellung der Entwicklung des neuronalen Netzwerkes (Servier & Munger 1965).
Levanol	Darstellung der Myelinisierung (Böck & Zschiesche 1978).

Tab. 1. Methoden zur Darstellung der untersuchten hirnstrukturellen Parameter und deren Bedeutung während der Ontogenese.

4. Material und Methoden

4.1 Versuchsablauf

Die Versuche wurden in San Antonio (Texas, USA) an der Southwest Foundation of Biomedical Research durchgeführt. Die Genehmigung der Versuche erfolgte durch das dort ansässige Animal Care and Use Committee. Die Institute der Southwest Foundation of Biomedical Research gehören zu den durch die Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) anerkannten wissenschaftlichen Einrichtungen.

Die Versuche wurden an Pavianen (*Papio hamadryas*) durchgeführt, die in Gruppen mit 16 weiblichen und einem männlichen vasektomierten Tier gehalten wurden, um den Konzeptionszeitpunkt exakt bestimmen zu können und eine ungeplante Konzeption zu verhindern. Nach einer Eingewöhnungsphase, in der sich die Tiere an die Gruppe und die individuelle Fütterung adaptierten, wurde das vasektomierte Männchen durch ein fruchtbares Männchen ersetzt. Um den Konzeptionszeitpunkt zu bestimmen, wurden die Schwellung der Genitale und das Auftreten von vaginalen Blutungen bei den Weibchen überwacht (Hendrickx & Peterson 1997). Der Beginn der Nahrungsrestriktion wurde am 30. Tag der Gestation gewählt, um die Implantation der Eizelle nicht zu gefährden und damit eine Fehlgeburt zu induzieren. Nachdem die Trächtigkeit am 30. Tag durch Ultraschall bestätigt wurde, begann die Nahrungsrestriktion, die bis zum 90. Tag der Trächtigkeit, an dem der Versuch endete, fortgesetzt wurde (Abb. 2). Als Nahrung wurde den Tieren die Purina Monkey Diet 5038 (Purina, St. Louis, Missouri, USA) angeboten, ein Trockenfutter, das von den Herstellern als Vollwertnahrung beschrieben wird, die für den kompletten Lebenszyklus eines Primaten geeignet ist. Es enthält mehr als 15% Protein, Fett mehr als 5%, Ballaststoffe nicht mehr als 6%, Asche nicht mehr als 5% und zusätzlich Mineralien nicht mehr als 3%, sowie Vitamin C und alle anderen erforderlichen Vitamine.

In Vorbereitung auf das Experiment erhielten die Tiere Futter *ad libitum* und die tägliche individuelle Nahrungsaufnahme wurde protokolliert. Die tatsächlich aufgenommene Futtermenge war wöchentlich stabil und wurde der Fütterung während des Versuches zugrunde gelegt. Eine Gruppe (n=8) von weiblichen Tieren erhielt 100% der Futtermenge (Kontrolle), während eine andere Gruppe (n=6) von weiblichen Tieren im Sinne einer mütterlichen Nahrungsrestriktion lediglich 70% der Futtermenge erhielt (Abb. 2).

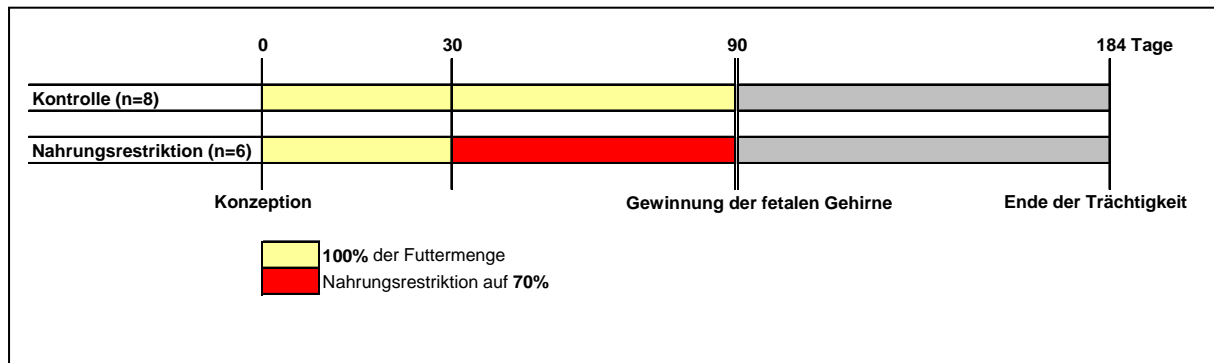


Abb. 2 Zeitlicher Versuchsablauf.

Zur individuellen Fütterung passierten die Paviane einmal täglich einen Gang, der über eine Waage (GSE 665; GSE Scale Systems, MI, USA) zu den Einzelkäfigen führte (Schlabritz-Loutsevitch et al. 2004a) und erhielten dort die jeweilige Futtermenge (Abb. 3). In den Einzelkäfigen war für jedes Tier der Gruppe die Futteraufnahme auf jeweils 2h begrenzt (Schlabritz-Loutsevitch et al. 2004a, Abb. 3). So konnte jedes Tier individuell seine Futtermenge aufnehmen, ohne dass andere Tiere die Futteraufnahme stören bzw. vermindern konnten. Die aufgenommene Futtermenge, das Gewicht und der allgemeine Gesundheitsstatus wurden täglich beurteilt und kontrolliert. Wasser stand den Tieren jederzeit zur Verfügung.

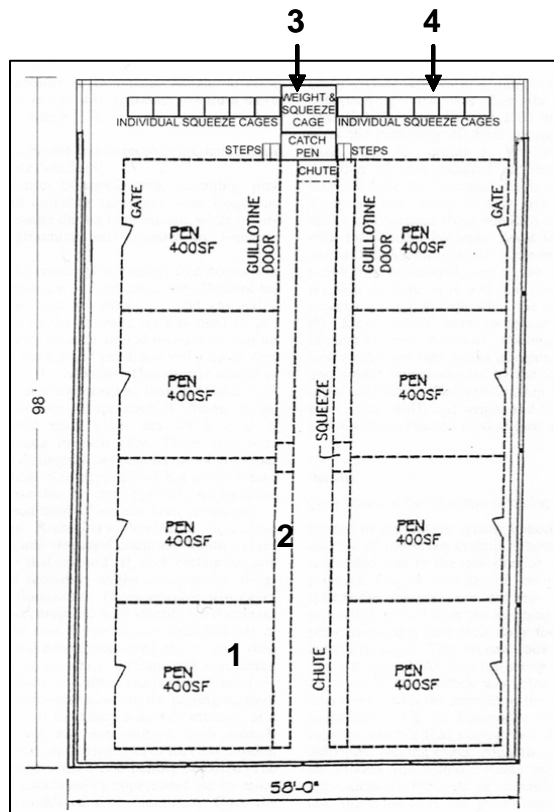


Abb. 3 Grundriss der Haltungsbedingungen (nach Schlabritz-Loutsevitch et al. 2004a).

Die Tiere wurden in den Gruppenkäfigen gehalten (1) und passierten einmal am Tag zu Fütterung einen Gang (2). Sie gelangten über eine Waage (3) zu den Einzelkäfigen (4), wo jedes Tier, getrennt von den anderen, seine individuelle Futtermenge erhielt.

4.2 Gewinnung der fetalen Gehirne

Bei einer Gesamtträchtigkeitsdauer der Paviane von 184 Tagen wurde am 90. Tag der Trächtigkeit, unter Benutzung von Standardtechniken ein Kaiserschnitt durchgeführt (Schlabritz-Loutsevitch et al. 2004b). Die präoperative Analgesie erfolgte durch 10mg/kg Ketamin intramuskulär (Ketaset; Animal Health, Fort Dodge, IA, USA). Nach Sedierung der Tiere und Inhalationsnarkose mit Isofluran über eine Maske, wurden die Tiere intubiert und die Anästhesie mit 2% Isofluran (2l/min) aufrechterhalten (Schlabritz-Loutsevitch et al. 2004b). Die fetalen Gehirne wurden, nach Gewinnung und Tötung der Feten durch eine intrakardiale Pentobarbital- Injektion von 7,8mg (Euthasol; Delmarva Laboratories, Inc. Midlothian, VA, USA), unverzüglich längs geschnitten und in beide Hemisphären geteilt. Die rechte Hemisphäre wurde in 6 Blöcke geschnitten und die Blöcke mit Phosphat-gepufferter 4% Paraformaldehydlösung immersionsfixiert. Die linke Hemisphäre wurde für biochemische Untersuchungen, die nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, präpariert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Nach Entnahme der Feten wurden dem Muttertier der Uterus und die Bauchdecken in Schichten regelgerecht vernäht. Eine postoperative Analgesie der Muttertiere wurde durch Buprenorphinhydrochlorid $0.015 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ für die ersten drei postoperativen Tage (Buprenex, Reckitt Benckiser, Hull, England) sichergestellt.

4.3 Herstellung der histologischen Präparate

Nach Einbettung der fixierten Gewebeproben in Paraffin wurden die Blöcke nach Deutschland überführt und serienweise $6\mu\text{m}$ dicke Gehirnschnitte vom frontalen Lappen 10mm hinter dem vorderen Pol beginnend, über dem lateralen Ventrikel angefertigt. Die Präparate wurden am Rotationsmikrotom (HM 335E, Microm, Deutschland) angefertigt und im Wasserbad bei ca. 50°C auf die Objektträger gezogen, beschriftet und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Von nun an war ich in die Anfertigung der Färbungen und Auswertungen der Schnitte involviert.

4.4 Histochemische und Immunhistochemische Untersuchungen

Es wurden zu jeder der unten aufgeführten immunhistochemischen Markierungen und Färbungen Negativkontrollen angefertigt, um das Färbeergebnis und die Antikörperbindung beurteilen zu können.

4.4.1 Darstellung der Hirnstrukturen

Als Übersichtsfärbung zur Darstellung der Hirnstrukturen wurde die Hämatoxylin-Eosin Färbung benutzt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst mit Xylol und absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und danach 5 min in Aqua dest. gespült. Anschließend wurden die Schnitte 9 min mit der Hämatoxylin Lösung nach Mayer inkubiert und danach unter fließendem Leitungswasser gewaschen und wieder 5 min mit Aqua dest. gespült. Die Schnitte wurden nun für 1 min in der Eosin- Lösung belassen, danach wieder mit Aqua dest. gespült und abschließend in absteigender Alkoholreihe gewaschen und schließlich erfolgte ein Balsameinschluss mit Entelan (MERCK, Darmstadt, Deutschland).

4.4.2 Zellproliferation und programmierter Zelltod

Zellproliferation

Die Zellproliferation wurde mit dem Antikörper gegen Ki67 immunhistochemisch dargestellt. Das Ki67 Antigen wird in allen proliferierenden Zellen in der späten G1-, der S-, der M- und der G2-Phase und damit nahezu im gesamten Zellzyklus exprimiert. Die Immunmarkierung der proliferierenden Zellen wurde mit mouse anti-NCL-ki67-MM1 (Novacastra, UK, 1:100), als primärer Antikörper, unter Benutzung der ABC-Technik (Vectastain Kit, Vector Labs, Burlingame, USA) ausgeführt. Die Präparate wurden zunächst in Xylol und absteigender Alkoholreihe entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger 2x10 min in Xylolersatz Neoclear (Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Danach wurden sie 2x5 min in 100% Isopropanol, 1x5 min in 80% Isopropanol und abschließend 1x5 min in 50% Isopropanol inkubiert.

Anschließend erfolgte die Blockierung endogener Peroxidasen. Dazu wurden die Objektträger 20 min in einer 0.6% Wasserstoffperoxidlösung neutralisiert und 10 min in Aqua dest. gespült. Danach wurden die Objektträger in einer 0.01 mol/l Citrat- Retrieval Lösung (ph6) in der Mikrowelle bei 750 Watt für 15 min erhitzt. Nach dem Abkühlen der Objektträger unter kalten Leitungswasser wurden die Schnitte 5 min in TBS (50mmol/l Tris gepufferte physiologische Kochsalzlösung, ph 7,6) mit Kippbewegungen gespült und danach 10 min mit verdünntem Normalserum bedeckt. Die Schnitte wurden nun mit dem primären Antikörper (mouse anti-NCL-ki67-MM1, Novacastra, Newcastle upon Tyne, UK) in einer Verdünnung von 1:100 für 60 min bei 25°C inkubiert. Danach wurden die Objektträger 2x5 min in TBS mit Kippbewegungen gespült und mit dem entsprechenden biotinylierten sekundären Antikörper (Anti- Mouse IgG, Anti-Rabbit IgG, Vectastain) inkubiert. Danach wurden die Schnitte wieder 2x5 min mit dem TBS unter Kippbewegungen gespült und mit einem Avidin-Meerrettichperoxidase- Komplex (ABC-Kit, Vectastain Elite ABC staining Kit, Vector Labs, Burlingame, USA) inkubiert. Anschließend wurde wieder 2x5 min mit TBS gespült, um die überschüssigen Komplexe zu beseitigen.

Zur Visualisierung der immunhistochemischen Reaktion diente DAB (Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidine Tablet Sets, Sigma-Aldrich-Chemie, Sternheim, Deutschland), welches von der im ABC-Komplex enthaltenen Peroxidase umgesetzt wird und einen farbigen und unlöslichen Komplex bildet. Die Objektträger wurden abschließend noch mit Aqua dest. gespült. Die Negativkontrollen wurden anstelle des primären Antikörpers mit normalem Mausserum inkubiert. Die Objektträger wurden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe

dehydriert und abschließend mit dem Eindeckmedium Neomount (Lab Vision Coop., Westinghouse Drive, Fremont, CA, USA) unter einem Deckgläschen verschlossen und konnten so unter dem Lichtmikroskop untersucht werden.

Apoptose

Apoptotische Zellen wurden durch die TUNEL *in situ* Hybridisierung gekennzeichnet (TUNEL Kit, Roche, Indianapolis, USA). Durch die TUNEL *in situ* Hybridisierung werden DNA-Strangbrüche, die vornehmlich während der Apoptose entstehen, angefärbt. Dies erlaubt eine Unterscheidung von Apoptose und Nekrose. Nachdem die Paraffinschnitte eine Nacht bei 56°C getrocknet wurden, begann das Entparaffinieren durch Waschen mit Xylol für 3x15 min, gefolgt von der Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe. Anschließend wurden die Objektträger mit Proteinase K bei 37°C für 20 min inkubiert und danach 3x5 min mit PBS gespült. Danach wurde die TUNEL-Reaktionsmischung, bestehend aus der Enzymlösung (Terminale Deoxynukleotid Transferase) und der Färbelösung (Nukleotid-Mischung in Reaktionspuffer), auf die Objektträger aufgebracht, mit einem Deckglas abgedeckt und bei 37°C 1h inkubiert. Für die Negativkontrollen wurde nur die Färbelösung benutzt. Danach wurden die Objektträger für 3x5 min mit PBS gespült und für 60 min in Blockpuffer (Kaninchenserum) eingestellt, um die freien Bindungen zu besetzen. Die Objektträger wurden mit einer Converter-AP-Lösung (Anti-Fluorescein Antikörper, Fab Fragmenten vom Schaf, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) bei 37°C für 30 min inkubiert und danach für 3x5 min mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Objektträger mit der Substratlösung Nitrotetrazolium-blau (NBT) für die alkalische Phosphatase für 10 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert und nach 3-maligem Waschen mit Kernechtrot, welches die Zellkerne rot erscheinen lässt, gegengefärbt. Danach wurden die Schnitte mit einem Deckglas und Glyceringelat eingedeckt und konnten unter dem Lichtmikroskop untersucht werden.

4.4.3 Neuronale Reifung

Zur Charakterisierung der neuronalen Reifung wurden die Antikörper gegen die neuronalen Proteine NeuN und Doublecortin benutzt. Für die Immunmarkierung von neuronalen Zellen wurde, wie in 4.4.2 beschrieben, die ABC-Methode in einer leichten Modifikation benutzt. Als Vorbehandlung der entparaffinierten Schnitte wurden sie 10 min in der Mikrowelle bei 750W in Zitratpuffer erhitzt.

Es wurden Antikörper gegen Doublecortin (anti- Doublecortin [C-18, anti-DCX], Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; 1:400) zur spezifischen Markierung von migrierenden neuronalen Vorläuferzellen (Couillard-Despres et al. 2005) benutzt.

Außerdem ist der Antikörper NeuN (anti-neuron-spezifisches nukleäres Antigen [anti-NeuN], Chemicon; Temecula, USA, 1:800) angewendet worden, welcher vor allem postmitotische, reife Neurone markiert (Sarnat et al. 1998).

4.4.4 Gliale Reifung

Um die gliale Reifung zu untersuchen, wurden Antikörper gegen GFAP und S-100 β benutzt. Für die Beurteilung der glialen Reifung wurde, wie in 4.4.2 beschrieben, die ABC-Methode benutzt, mit Ausnahme der Vorbehandlung der entparaffinierten Schnitte in der Mikrowelle bei 750W für 10 min in Zitratpuffer.

Für die Darstellung unreifer Astrozyten wurde ein Antikörper gegen das Protein S-100 β (anti-S-100 β , Swant, Bellinzona, Switzerland; 1:2500) benutzt (Burette et al. 1998). Die Antikörper gegen das Protein GFAP (anti-gliale Fibrinsäure Protein [anti-GFAP], Chemicon, Temecula, USA; 1:800) wurden zur Darstellung von reifen Astrozyten und radialen Gliazellen benutzt (Rakic 2003).

4.4.5 Entwicklung des neuronalen Netzwerkes

Die Silberverstärkung nach Servier & Munger (1965) wurde zur Darstellung des neuronalen Netzwerkes benutzt und dient der Beurteilung der Neuritendichte. Nach dem Entparaffinieren der Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe, wurden die Schnitte für 3 min in Aqua dest. und anschließend in Aqua bidest. gespült. Danach wurden die Objektträger 90 min bei 37°C mit Silbernitrat (AgNO₃, 20%) inkubiert und anschließend 2x mit Aqua dest. und 1x mit Aqua bidest. gespült. Die Schnitte wurden nun für 30 min bei 45°C in ammoniakalischer Silbernitratlösung inkubiert und danach 3x mit Aqua bidest. und Ammoniak, sowie 1x mit Aqua bidest. gespült. Anschließend wurden die Objektträger mit einer Entwicklerlösung (Aqua bidest., Zitronensäure, Formalin 36%, konzentrierte Salpetersäure, ammoniakalische Silbernitratlösung) 2 min leicht geschüttelt und danach wieder 3x mit Aqua bidest. und Ammoniak, sowie 1x mit Aqua bidest. gespült. Abschließend wurden die Schnitte für 1-3 min mit 5% Natrium-Thiosulfat, danach 5 min mit Leitungswasser und 5 min mit Aqua dest.

gespült und schließlich entwässert und mit Eindeckmedium und einem Deckgläschen versehen. Anschließend wurden die Schnitte unter dem Lichtmikroskop untersucht und die Neuritendichte beurteilt.

4.4.6 Myelinisierung

Zur Darstellung der Myelinisierung diente die Levanol-Färbung (Chroma, Münster, Deutschland). Nachdem die Schnitte mit Xylol und in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert wurden, sind sie 5 min in Aqua dest. gespült worden. Anschließend sind die Objektträger 5 min in 0,5% Kernechtrot-Aluminiumsulfat und danach mit Aqua dest. gewaschen worden. Die Objektträger wurden danach mit 1% wässriger Phosphorwolframsäure 5 min und danach nochmals mit Aqua dest. gespült. Nach 3 min in 96% Methanol kamen die Präparate für 5 min in die Levanollösung (Levanol Fast Cyanin, Methanol, Eisessig) und wurden abschließend 3x in ein Methanol-Eisessig-Gemisch (9:1) eingetaucht. Nach 10 min in einer 100% Methanollösung und 1 min in 100% Isopropanol wurden die Schnitte eingedeckt und konnten unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden. Die Levanol-Färbung ist eine spezifische Kennzeichnung von Myelin und eignet sich insbesondere für mit Paraffin eingebettetes Hirngewebe (Böck & Zschiesche 1978), wobei die Markscheiden kornblumenblau und die Zellkerne rosa-rot im Lichtmikroskop erscheinen.

4.4.7 Glukokortikoidrezeptoren

Zur immunhistochemischen Darstellung der Glukokortikoidrezeptoren wurden die Schnitte nach dem Entparaffinieren mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe 2 min mit Aqua dest. behandelt. Es diente auch hier die ABC-Methode zur immunhistochemische Darstellung der Antigen-Antikörper-Bindung. Als primärer Antikörper diente ein Anti- Glukokortikoid-Rezeptor Antikörper (anti-glucocorticoid-receptor; Affinity BioReagents, Golden, Colorado, USA 1:60), um die Glukokortikoidrezeptoren darzustellen (Sackey et al. 1996).

4.4.8 Neuronale Zytoskelettproteine

Zur Darstellung der Mikrotubuli- assoziierten Proteine wurde wie in 4.4.2 beschrieben die ABC-Methode benutzt, mit Ausnahme der Vorbehandlung der entparaffinierten Schnitte in der Mikrowelle bei 750W für 10 min in Zitratpuffer. Für die immunhistochemische Darstellung von MAP2a,b wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das Protein (anti-MAP2a,b, Sigma, Saint Louis, Missouri; USA, 1:500) benutzt (Johnson & Jope 1992). Zur Darstellung von MAP1B diente ebenfalls ein monoklonaler Antikörper (anti-MAP1B, Sigma, Saint Louis, Missouri; USA, 1:500) (Tucker 1990).

4.4.9 Glukosetransportproteine 1 und 3

Die Darstellung von GLUT1 und 3 wurde mittels ABC-Methode, wie in 4.4.2 beschrieben, mit Ausnahme der Vorbehandlung der entparaffinierten Schnitte in der Mikrowelle bei 750W für 10 min in Zitratpuffer, durchgeführt. Als primäre Antikörper für GLUT1 und 3 dienten polyklonale Antikörper (Rabbit-anti-GLUT1, Chemicon, Temecula, USA, 1:1500; Rabbit-anti-GLUT3, Chemicon, Temecula, USA, 1:300) (Gerhart et al. 1989).

4.5 Quantifizierung der untersuchten Parameter

4.5.1 Untersuchte Hirnregionen

In unserer Studie habe ich mich auf die drei Schlüsselregionen der frühen Gehirnentwicklung beim Primaten konzentriert: die proliferativ aktive Subventrikulärzone, die Intermediärzone, durch die die Zellen von der Subventrikulärzone heraus wandern, und die kortikale Platte, eine der Hauptzielregionen von migrierenden Zellen.

4.5.2 Quantifizierung der strukturellen, zellulären und subzellulären Veränderungen

Die Gewebeschnitte wurden in einer für die untersuchten Parameter adäquaten Vergrößerung (x1 - x250) unter Verwendung einer 3CCD Color Videokamera (AxioCam Colour, 412-312, Zeiss, Germany) digitalisiert. Alle Auswertungen (Sterologie, Fläche der

immunhistochemischen Markierungen) fanden also nicht direkt am Mikroskop statt, sondern wurden anhand der digitalisierten mikroskopischen Schnitte unter Nutzung eines Bildverarbeitungsprogramms (Scion Image 6.23, NIH, USA), ohne Kenntnis des experimentellen Protokolls, durchgeführt.

4.5.2.1 Morphometrie der Hirnstruktur

Morphometrische Messungen wurden in der HE- Färbung durchgeführt. Es wurde die Flächen der gesamten Hemisphäre und der kortikalen Platte, sowie die Breite der kortikalen Platte, der Intermediärzone und der Subventrikulärzone ausgemessen.

4.5.2.2 Quantifizierung von Zellproliferation und Zelltod

Die Ki67-positiven Zellen wurden in einem Feld von 0.2 mm² bei 40-facher Vergrößerung in der Subventrikulärzone, der Intermediärzone und der kortikalen Platte gezählt und auf 1 mm² verrechnet. Die Auswahl des Feldes zum Zählen der Ki67-positiven Zellen geschah nach Beurteilung der gesamten jeweiligen Hirnregion und entsprach einem repräsentativen Bild für die jeweilige Zone bei jedem Versuchstier. Die TUNEL- positiven Zellen wurden aufgrund ihres geringen Vorkommens in 5 mikroskopischen Gesichtsfeldern mit 40-facher Vergrößerung ebenfalls in einem Feld von 0,2 mm² in der Subventrikulärzone, der Intermediärzone und der kortikalen Platte gezählt, der Mittelwert wurde gebildet und die Zellen wurden auf 1 mm² verrechnet. Die jeweilige Auswahl der 5 Gesichtsfelder zum Zählen der TUNEL- positiven Zellen geschah ebenfalls nach Beurteilung der gesamten Region und entsprach einem repräsentativen Bild für die jeweilige Zone bei jedem Versuchstier. Es wurden 5 Gesichtsfelder ausgezählt, um Fehler durch die Auswahl unrepräsentativer Felder zu vermeiden, da die Anzahl TUNEL-positiver Zellen pro Gesichtsfeld teilweise relativ gering war (Tab. 5). Neben der Anzahl von proliferierenden und apoptotischen Zellen wurde auch das Verhältnis von Apoptose zu Zellproliferation in der Subventrikulärzone, der Intermediärzone und der kortikalen Platte bestimmt (Tab. 5).

4.5.2.3 Quantifizierung von neuronaler und glialer Reifung, Glukokortikoidrezeptoren, neuronalen Zytoskelettproteinen und Glukosetransportproteinen

Die histochemischen Färbungen wurden durch die Messung der Fläche der spezifischen Markierung für die neuronale und gliale Reifung, sowie für die Glukokortikoidrezeptoren, die neuronalen Zytoskelettproteine und die Glukosetransportproteine in einem Feld von 0.2 mm² in der Subventrikulärzone, der Intermediärzone und der kortikalen Platte ermittelt. Um die Fläche der positiven Immunmarkierung zu bestimmen, wurde unter visueller Kontrolle im Vergleich mit dem mikroskopischen Bild ein Schwellwert festgelegt. Alle Grauwerte unterhalb des Schwellwertes galten als nicht markiert, während die Grauwerte, die gleich und größer dem Schwellwert waren, im Rahmen der Messgenauigkeit als immunmarkiert erfasst wurden. Somit wurde jedem Bild ein Absolutwert der markierten Fläche zugeordnet.

Bei der Messung der Markierung für S-100 β , als Marker für die gliale Reifung, wurde nur das intrazelluläre Vorkommen, durch Anpassung des Schwellwertes berücksichtigt, also die Markierung unreifer Astrozyten, da S-100 β zugleich ein neurotropher Faktor ist, der auch extrazellulär vorkommt (Burette et al. 1998). Durch den Vergleich mit den Negativkontrollen wurden falschpositive Immunmarkierungen ausgeschlossen. Um den Reifegrad der Verzweigung der reifen Astrozyten zu bestimmen, wurde durch mich ein Bewertungssystem entwickelt, welches ermöglichte die Anzahl der Verzweigungen von Astrozyten zu bestimmen und damit, neben der Immunoreaktivität (IR) von reifen Astrozyten, den Reifegrad anhand der Verzweigungen zu beschreiben (Tab. 2). Es wurden die in einem Ausschnitt von 0.2 mm² vorhandenen Astrozyten, jeweils in der Intermediärzone und der kortikalen Platte, gezählt und die Anzahl der Zellfortsätze bestimmt (Tab. 2). Reife Astrozyten finden sich nur in der kortikalen Platte und der Intermediärzone, so dass auf die Bestimmung des Reifegrades in der Subventrikulärzone verzichtet wurde. Die Bestimmung des Reifegrades von Astrozyten geschah jeweils an einer charakteristischen Zelle, für das untersuchte Feld in der kortikalen Platte bzw. in der Intermediärzone (Tab. 8).

Reifegrad der Astrozyten (Score)	Beurteilung der Verzweigung
1	0-1 Verzweigungen
2	1 Verzweigung mit Verzweigungen 2. Ordnung oder 2 Verzweigungen
3	2-3 Verzweigungen mit Verzweigungen 2. Ordnung
4	4 Verzweigungen mit Verzweigungen 2. Ordnung
5	5 Verzweigungen mit Verzweigungen 2. Ordnung
6	6 Verzweigungen mit Verzweigungen 2. Ordnung

Tab. 2 Bewertungssystem zur Beurteilung des Reifegrades der Astrozyten.

4.5.2.4 Quantifizierung von neuronaler Arborisierung und Myelinisierung

Die Ausbildung des neuronalen Netzwerkes wurde in einem Feld von 0.2 mm² durch Messung der Fläche der mit Silberimprägnation markierten Neuriten in der Intermediärzone und der kortikalen Platte ermittelt. Die beginnende Myelinisierung wurde in der Intermediärzone und der kortikalen Platte durch die Messung der mit der Levanol-Färbung markierten Fläche in einem Feld von 0.2 mm² ermittelt.

4.6 Statistische Auswertung

Der Vergleich der gemessenen Parameter zwischen der Kontrollgruppe und der nahrungsrestrikierten Gruppe erfolgte mit dem nichtparametrischen U-Test nach Mann & Whitney, da keine Kenntnis über die Verteilung bestand und der Stichprobenumfang für eine Testung auf Normalverteilung zu gering war.

Außerdem wurden die jeweilig untersuchten histologischen und immunhistochemischen Markierungen zwischen den Schlüsselregionen innerhalb einer Gruppe zunächst mit dem nichtparametrischen Friedman Test als Globaltest auf Unterschiede getestet. Wenn sich ein signifikanter Unterschied zwischen den 3 untersuchten Regionen einer Gruppe ergab, wurde dieser anschließend mit dem Wilcoxon Test getestet. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0.05$ festgelegt.

5. Ergebnisse

5.1 Stand der Hirnentwicklung zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer

Zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer ist das fetale Gehirn des Pavians mit dem 5- Schicht Stadium beim Rhesusaffen vergleichbar (Rakic 1978). Das Primatengehirn besteht zu diesem Zeitpunkt aus einer Ventrikulärzone und einer Subventrikulärzone, in denen die Zellproliferation stattfindet (Rakic 1978, Abb. 4). Es folgt die Intermediärzone, durch die die neu gebildeten Zellen in ihre Zielgebiete wandern und letztlich die kortikale Platte und die Marginalzone (Rakic 1978, Abb. 4).

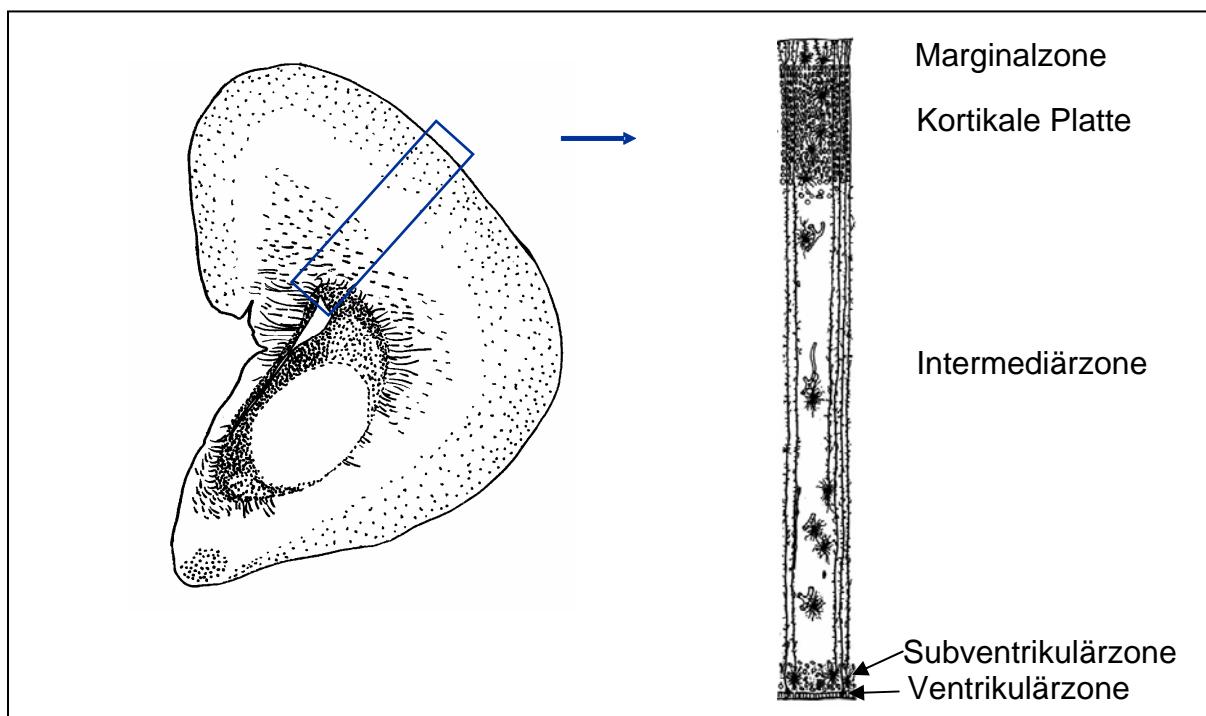


Abb. 4 Morphologie des Primatengehirns zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer. (mod. nach Rakic 1978)

5.1.1 Subventrikulärzone

In der Subventrikulärzone, als fetale Proliferationszone, fanden sich besonders die radialen Gliazellen, die mit GFAP markiert wurden, sowie unreife Astrozyten, die mit S-100 β markiert wurden (Abb. 5). Auch neuronale Vorläuferzellen, die mit Doublecortin markiert wurden, waren in der Subventrikulärzone vorhanden (Abb. 5). Reife Neurone, markiert mit NeuN, waren in der Subventrikulärzone nicht nachweisbar (Abb. 5).

5.1.2 Intermediärzone

In der Intermediärzone waren ebenfalls radiale Gliazellen und ihre Fortsätze sichtbar (Abb. 5). Die Fortsätze der radialen Gliazellen erstreckten sich über die gesamte Breite des fetalen Gehirns von der Subventrikulärzone bis zur kortikalen Platte hin (Abb. 5). In der Intermediärzone fanden sich nur vereinzelt unreife Astrozyten, sowie unreife neuronale Vorläuferzellen und reife Neurone (Abb. 5). Außerdem ist das Vorkommen von S-100 β , als neurotropher Faktor, im Extrazellulärraum in der Intermediärzone sichtbar (Abb. 5).

5.1.3 Kortikale Platte

In der kortikalen Platte war das Vorkommen unreifer und reifer Astrozyten nachweisbar (Abb. 5). Neuronale Vorläuferzellen waren ebenfalls in der kortikalen Platte vorhanden (Abb. 5). Außerdem fanden sich zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer in der kortikalen Platte bereits reife Neurone (Abb. 5).

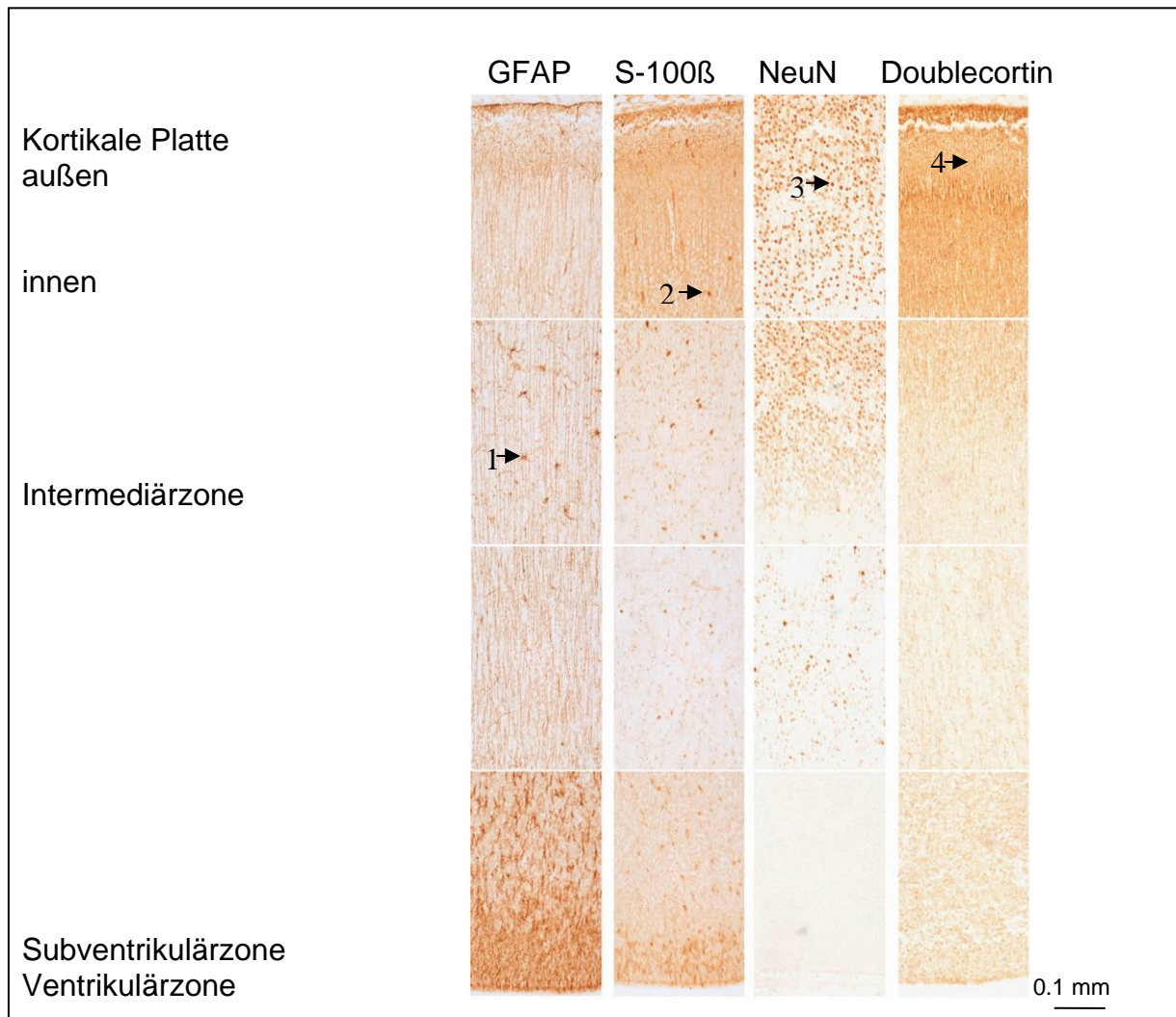


Abb. 5 Entwicklungsstand des Gehirns zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer.

Dargestellt ist der Entwicklungsstand des fetalen Gehirns zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer beispielhaft bei einem Kontrolltier. Deutlich erkennbar sind die Ventrikulärzone und die proliferativ aktive Subventrikulärzone, sowie die Intermediärzone, durch die die neu gebildeten Zellen zu ihren Zielgebieten, z. B. der kortikalen Platte, wandern. Die jeweiligen Markierungen verdeutlichen das Vorkommen von radialen Gliazellen und reifen Astrozyten (GFAP), unreifen Astrozyten (S-100β), sowie das Vorkommen von S-100β als neurotropher Faktor im Extrazellulärraum, reifen Neuronen (NeuN) und migrierenden neuronalen Vorläuferzellen (Doublecortin) in den jeweiligen Regionen des fetalen Gehirns. 1 Radiale Gliazelle; 2 Unreifer Astrozyt; 3 Reifes Neuron; 4 Neuronale Vorläuferzelle.

5.2 Effekte mütterlicher Nahrungsrestriktion auf das Wachstum

Moderate mütterliche Nahrungsrestriktion von 30% führte zu keinen wesentlichen Veränderungen der fetalen Körper- und Gehirngewichte zur Hälfte der Trächtigkeit (Tab. 3).

	Kontrolle (n=8)	Mütterliche Nahrungsrestriktion (n=6)
Fetales Körpergewicht in g	100.9 ± 3.8	95.4 ± 3.3
Fetales Gehirngewicht in g	32.6 ± 1.8	30.2 ± 0.5

Tab. 3 Fetale Körper- und Gehirngewichte. MW±SEM. Dargestellt sind die fetalen Körper- und Gehirngewichte in g zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer bei den Kontrollfeten und nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion.

5.3 Effekte mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Hirnentwicklung

5.3.1 Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Morphologie des Gehirns

Mütterliche Nahrungsrestriktion von 30% veränderte die Morphologie des fetalen Gehirns auf subzellulärer Ebene in der Subventrikulärzone (Tab. 4). Die Breite der Subventrikulärzone zeigte eine Reduktion auf 56.6% nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30% ($p < 0.05$, Tab. 4, Abb. 6). Weitere Strukturen, wie die Intermediärzone und die kortikale Platte zeigten keine Veränderungen durch mütterliche Nahrungsrestriktion (Tab. 4). Die Fläche der gesamten Hemisphäre und der kortikalen Platte, sowie das Verhältnis zwischen kortikaler Platte und Hemisphäre blieben ebenfalls durch mütterliche Nahrungsrestriktion von 30% unbeeinträchtigt (Tab. 4).

	Kontrolle (n=8)	Mütterliche Nahrungsrestriktion (n=6)
Breite in mm		
Subventrikulärzone	0,75 ± 0,27	0,42 ± 0,09*
Intermediärzone	3,72 ± 0,35	3,76 ± 0,27
Kortikale Platte	0,81 ± 0,06	0,80 ± 0,09
Fläche in mm²		
Kortikale Platte	15,80 ± 2,64	15,97 ± 2,92
Gesamtfläche	94,52 ± 10,87	83,03 ± 9,48
Verhältnis (Kortikale Platte/ Gesamtfläche)	0,17 ± 0,04	0,19 ± 0,03

Tab. 4 Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf morphologische Parameter der fetalen Gehirne im Vergleich zu den Kontrolltieren. MW±SEM; * $p < 0.05$ im Vergleich zu den Kontrollen.

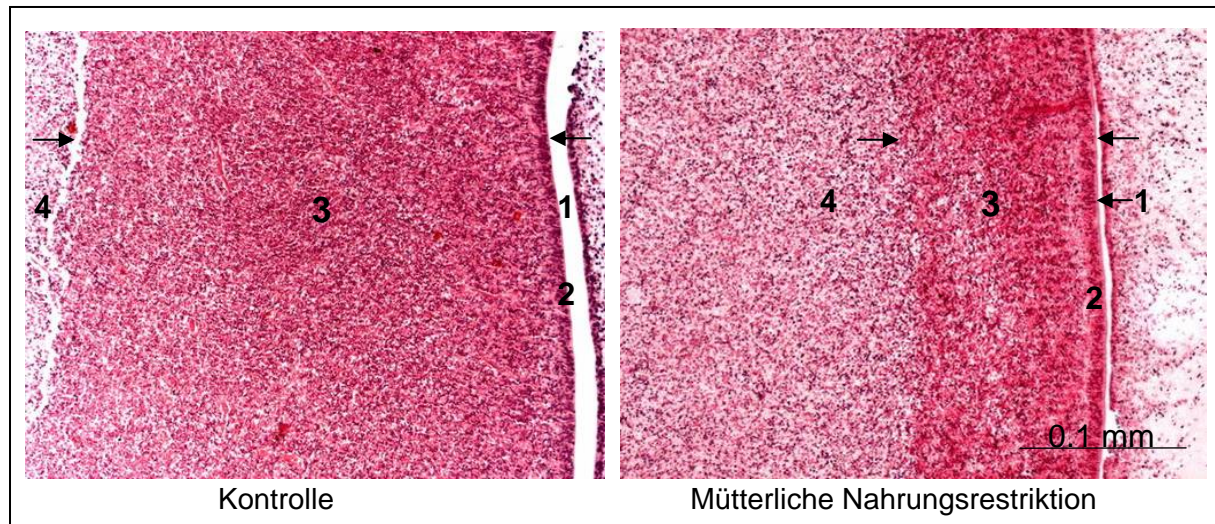


Abb. 6 Reduktion der Breite der Subventrikulärzone nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion.

Dargestellt ist die Breite der Subventrikulärzone (Pfeile) beispielhaft bei einem Kontrolltier und nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion in der Hämatoxylin Eosin Färbung. 1 Ventrikel; 2 Ventrikulärzone; 3 Subventrikulärzone; 4 Intermediärzone.

5.3.2 Zellproliferation und programmierter Zelltod

Die Immunmarkierung der proliferierenden Zellen wurde mit Ki67 durchgeführt und die apoptotischen Zellen wurden mit der TUNEL *in situ* Hybridisierung dargestellt.

Die Anzahl von proliferierenden Zellen war in beiden Gruppen in der Subventrikulärzone am höchsten, gefolgt von der Intermediärzone und schließlich der kortikalen Platte (jeweils $p < 0.05$, Tab. 5). Die höchste Zahl von proliferierenden Zellen in der Subventrikulärzone zeigt die Bedeutung dieser Zone als eine wichtige Proliferationszone des fetalen Gehirns ($p < 0.05$, Tab. 5). Im weiteren Verlauf der Migration durch die Intermediärzone und im Zielgebiet, der kortikalen Platte, nimmt die Zahl proliferierender Zellen kontinuierlich ab ($p < 0.05$, Tab. 5).

Mütterliche Nahrungsrestriktion führte in der Subventrikulärzone zu einer Zunahme der Zahl von proliferierenden Zellen pro mm^2 um 42.5% ($p < 0.05$, Tab. 5, Abb. 7). Damit erhöhte sich die Zelldichte in der Subventrikulärzone, da die Subventrikulärzone nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion auf 56.6% ($p < 0.05$, Tab. 4, Abb. 6) verschmälert war. Als ein Ergebnis der höheren Zelldichte in der Subventrikulärzone von Feten nach mütterlicher Nahrungsrestriktion blieb die Gesamtzahl von proliferierenden Zellen in der Subventrikulärzone in beiden Gruppen unverändert.

Mütterliche Nahrungsrestriktion veränderte nicht die Zahl von proliferierenden Zellen pro mm^2 in der Intermediärzone und der kortikalen Platte (Tab. 5).

	Kontrolle (n=8)	mütterliche Nahrungsrestriktion (n=6)
Anzahl proliferierender Zellen pro mm²		
Subventrikulärzone	13830 ± 4568 [§]	19711 ± 1094 ^{*§}
Intermediärzone	3612 ± 841	3773 ± 619
Kortikale Platte	24 ± 17	20 ± 18
Anzahl apoptotischer Zellen pro mm²		
Subventrikulärzone	27 ± 9	60 ± 27 [*]
Intermediärzone	978 ± 391 [§]	1225 ± 473 [§]
Kortikale Platte	9 ± 4	12 ± 10
Verhältnis Apoptose/ Zellproliferation (%)		
Subventrikulärzone	0.20 ± 0.07 [§]	0.30 ± 0.16 ^{(*)§}
Intermediärzone	28 ± 13	30 ± 10
Kortikale Platte	281 ± 360	278 ± 282

Tab. 5 Effekte von 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Zellproliferation und Zelltod zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer im Vergleich zu den Kontrolltieren. MW±SEM; * p<0.05 und (*) p<0.1 im Vergleich zu den Kontrollen, § p<0.05 jeweils im Vergleich zur Intermediärzone und kortikalen Platte, § p<0.05 jeweils im Vergleich zur kortikalen Platte und Subventrikulärzone.

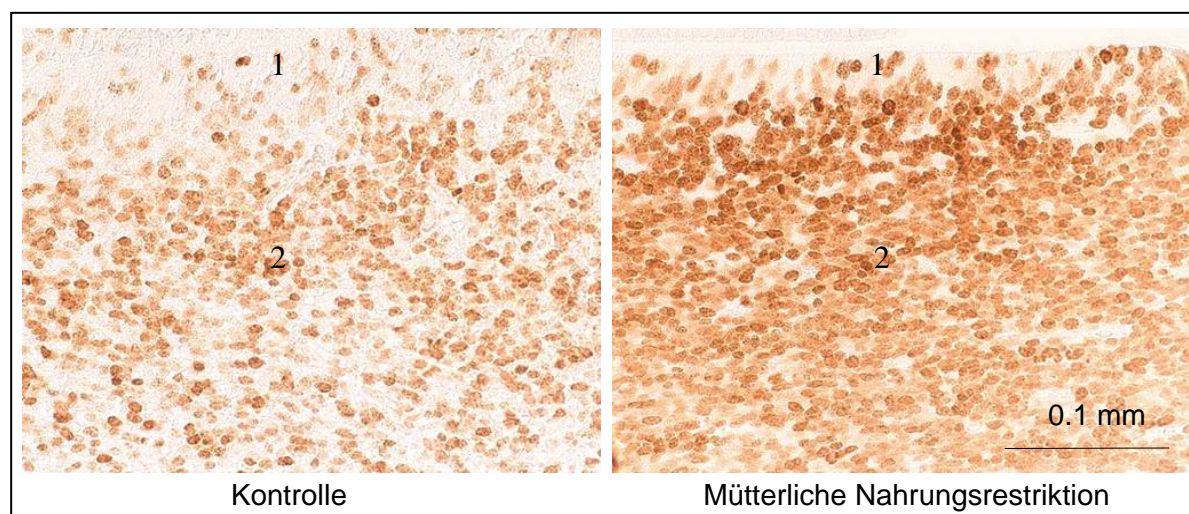


Abb. 7 Effekte von 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Anzahl proliferierender Zellen (Ki67) in der Subventrikulärzone.

Abgebildet sind die Ventrikulärzone (1) und die Subventrikulärzone (2), sowie die mit einem braunen Präzipitat markierten proliferierenden Zellen beispielhaft bei einem Kontrolltier und nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion. Mütterliche Nahrungsrestriktion führte zu einer Zunahme der Anzahl von proliferierenden Zellen pro mm² in der Subventrikulärzone.

Die höchste Rate von programmiertem Zelltod kam in beiden Gruppen in der Intermediärzone vor (p<0.05, Tab. 5), während in der Subventrikulärzone und der kortikalen Platte die Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zur Intermediärzone geringer war (p<0.05, Tab. 5). Der Großteil neu gebildeter Zellen wird also nicht in der proliferativen Subventrikulärzone

eliminiert, sondern während ihrer Migration durch die Intermediärzone (Tab. 5). Die niedrige Anzahl von apoptotischen Zellen in der kortikalen Platte im Vergleich zur Intermediärzone in beiden Gruppen, weist ebenfalls auf den Zelltod während der Migration hin ($p < 0.05$, Tab. 5). Die meisten Zellen wurden wohl schon vorher, während der Migration durch die Intermediärzone, apoptotisch. Das Verhältnis zwischen Apoptose und Zellproliferation ist in der Subventrikulärzone im Vergleich zum Verhältnis von Apoptose und Zellproliferation in der Intermediärzone und der kortikalen Platte am geringsten, was das Überwiegen der Proliferation in dieser Zone anzeigt ($p < 0.05$, Tab. 5). Während das hohe Verhältnis von Apoptose und Zellproliferation in der Intermediärzone und der kortikalen Platte im Vergleich zur Subventrikulärzone zeigt, dass dort jeweils die Apoptose überwiegt ($p < 0.05$, Tab. 5). Mütterliche Nahrungsrestriktion von 30% erhöhte die Zahl von TUNEL- positiven Zellen pro mm^2 und damit die Apoptose in der Subventrikulärzone um 118.9% ($p < 0.05$, Tab. 5, Abb. 8). In der Subventrikulärzone zeigte sich nach mütterlicher Nahrungsrestriktion ein tendenzieller Anstieg des Verhältnisses von apoptotischen Zellen zur Zellproliferation pro mm^2 um 53.6% ($p < 0.1$, Tab. 5).

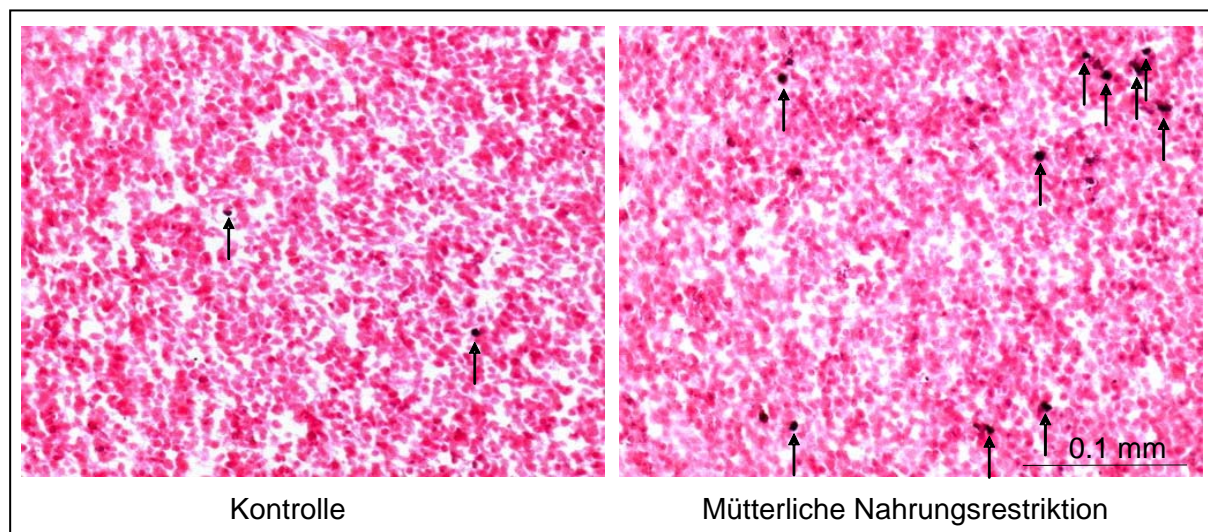


Abb. 8 Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Anzahl apoptotischer Zellen (TUNEL) in der Subventrikulärzone.

Dargestellt ist die Subventrikulärzone mit den dunkel gefärbten apoptotischen Zellen (Pfeile) beispielhaft bei einem Kontrollfeten und nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion. Es zeigt sich eine Zunahme von apoptotischen Zellen nach mütterlicher Nahrungsrestriktion. Als Hintergrundfärbung wurde die Kernechtrot-Färbung benutzt (rote Zellkerne).

Mütterliche Nahrungsrestriktion veränderte nicht die Anzahl von apoptotischen Zellen in der Intermediärzone, sowie das Verhältnis von Apoptose zu Zellproliferation in der Intermediärzone (Tab. 5). In der kortikalen Platte zeigten sich nach 30% mütterlicher

Nahrungsrestriktion ebenfalls keine Veränderungen, sowohl in der Zellzahl von apoptotischen Zellen, als auch im Verhältnis zwischen Apoptose und Zellproliferation (Tab. 5).

5.3.3 Neuronale Reifung

Doublecortin, als Marker für unreife migrierende Neurone, kam in den Zellkörpern mit einem perinukleären Färbungsmuster vor (Abb. 9 und 10). Die unreifen Neurone waren in beiden Gruppen hauptsächlich in der Subventrikulärzone ($p < 0.05$, Tab. 6, Abb. 9) zu finden, was auf die Proliferationsaktivität dieser Region hinweist. Gelegentlich waren auch unreife Neurone in der Intermediärzone und der kortikalen Platte (Abb. 10) zu finden, was darauf hinweist, dass unreife Neurone erst bis in die kortikale Platte wandern, um sich dort zu differenzieren (Tab. 6). Mütterliche Nahrungsrestriktion von 30% führte in keiner der untersuchten Regionen des fetalen Primatengehirns zu Veränderungen bei der Ausbildung unreifer Neurone (Tab. 6).

	Kontrolle (n=8)	mütterliche Nahrungsrestriktion (n=6)
Doublecortin (unreife Neurone)	Markierte Fläche in $\text{mm}^2 \times 10^{-2}$	
Subventrikulärzone	2,32 \pm 0,47 ^{\$}	2,68 \pm 0,52 ^{\$}
Intermediärzone	0,66 \pm 0,27	0,43 \pm 0,08
Kortikale Platte	0,54 \pm 0,31	0,99 \pm 0,34
NeuN (reife Neurone)		
Subventrikulärzone	0,010 \pm 0,006 ^{\$}	0,019 \pm 0,014 ^{\$}
Intermediärzone	0,39 \pm 0,21	0,50 \pm 0,34
Kortikale Platte	1,69 \pm 1,22 ^{\$}	1,69 \pm 0,94 ^{\$}

Tab. 6 Neuronale Reifung bei den Kontrolltieren und nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion. MW \pm SEM; * $p < 0.05$ im Vergleich zu den Kontrollen; ^{\$} $p < 0.05$ jeweils im Vergleich zur Intermediärzone und kortikalen Platte; [§] $p < 0.05$ jeweils im Vergleich zur Subventrikulärzone und Intermediärzone.

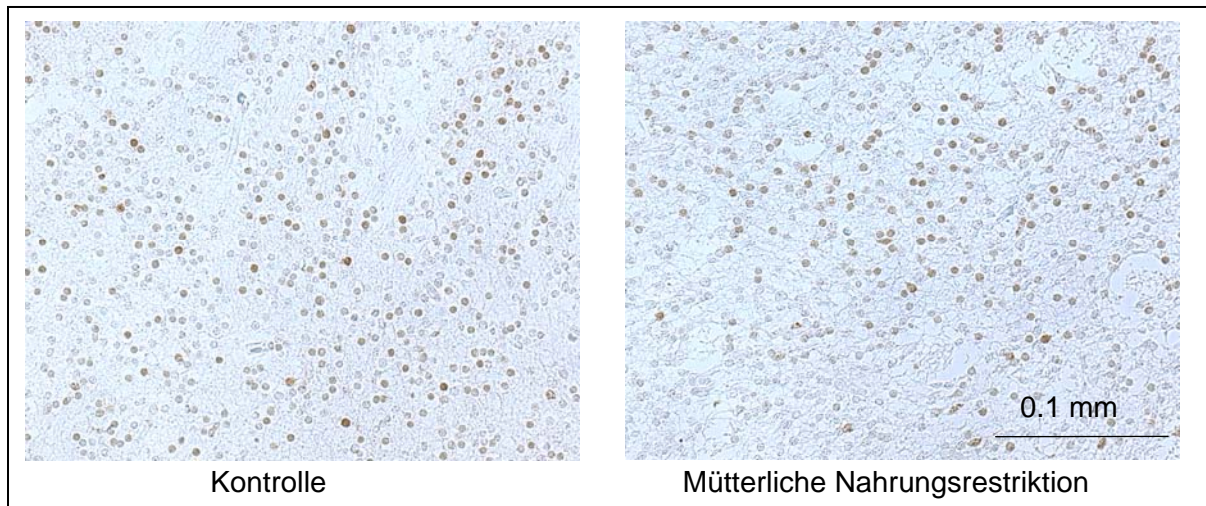


Abb. 9 Unreife Neurone in der Subventrikulärzone (Doublecortin).

Abgebildet sind die mit einem braunen Präzipitat markierten neuronalen Vorläuferzellen in der Subventrikulärzone beispielhaft bei einem Kontrollfeten und nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion. Mütterliche Nahrungsrestriktion bewirkte keine Veränderungen der unreifen Neuronen in der Subventrikulärzone.

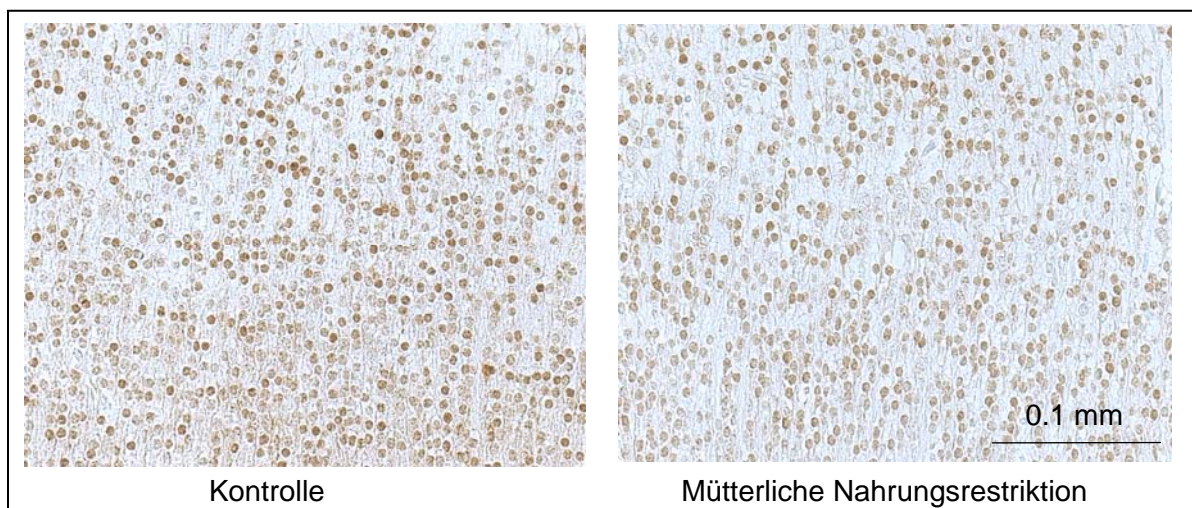


Abb. 10 Unreife Neurone in der kortikalen Platte (Doublecortin).

Abgebildet ist die kortikale Platte beispielhaft bei einem Kontrollfeten und nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion, sowie die mit einem braunen Präzipitat markierten unreifen Neuronen. Es zeigten sich keine Unterschiede nach mütterlicher Nahrungsrestriktion in der kortikalen Platte.

NeuN, ein Marker für reife Neurone, zeigte ein distinktes und selektives Färbungsmuster der Zellkerne (Abb. 11). Reife Neurone, kamen in beiden Gruppen nicht in der Subventrikulärzone vor und waren vor allem in der kortikalen Platte im Vergleich zur Subventrikulärzone und Intermediärzone nachweisbar ($p < 0.05$, Tab. 6).

Das hohe Vorkommen reifer Neurone in der kortikalen Platte zeigt, wie die geringe Zahl unreifer Neurone in dieser Region (siehe oben), die Reifung der Neurone im Zielgebiet der Migration ($p < 0.05$, Tab. 6, Abb. 11). In der kortikalen Platte wurde der Hauptanteil von reifen Neuronen in der inneren Schicht der kortikalen Platte gefunden, welches das

Entwicklungsmuster von der inneren zur äußeren neokortikalen Schicht reflektiert (Abb. 11). Mütterliche Nahrungsrestriktion von 30% zum Zeitpunkt 0.5 der Gestation bewirkte keine Veränderungen im Vorkommen und der Ausbildung von reifen Neuronen (Tab. 6).

Die neuronale Reifung blieb durch mütterliche Nahrungsrestriktion von 30% damit scheinbar in den untersuchten Hirnregionen unbeeinträchtigt (Tab. 6).

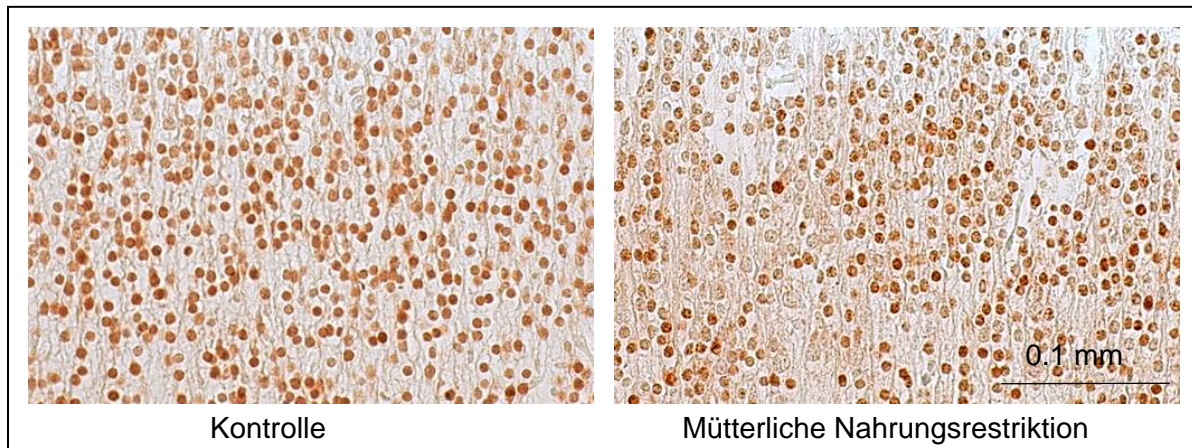


Abb. 11 Reife Neurone (NeuN) in der kortikalen Platte.

Abgebildet ist die kortikale Platte beispielhaft bei einem Kontrollfeten und nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion, sowie die mit einem braunen Präzipitat markierten reifen Neuronen, die in dieser Region der fetalen Gehirns am höchsten konzentriert waren und nicht durch mütterliche Nahrungsrestriktion verändert wurden. Es zeigt sich ein selektives Färbungsmuster der Zellkerne.

5.3.4 Gliale Reifung

Die Zellkörper und Fortsätze der unreifen Astrozyten, mit S-100 β markiert, waren in der Subventrikulärzone, der Intermediärzone und der kortikalen Platte reichlich vorhanden und gut darstellbar (Tab. 7, Abb. 5). In Übereinstimmung mit seiner Funktion als neurotropher Faktor, der extrazellulär freigesetzt wird, war die S-100 β IR nicht auf zelluläre Strukturen beschränkt (Abb. 12). Bei der Messung der Markierung wurde jedoch nur das intrazelluläre Vorkommen, also die Markierung unreifer Astrozyten, berücksichtigt. Die größte markierte Fläche, das heißt die höchste Zahl an unreifen Astrozyten kam bei den Kontrolltieren in der Subventrikulärzone vor, was auf die Bedeutung dieser Zone als Proliferationszone hinweist und vermuten lässt, dass S-100 β ein Stimulator der Proliferation ist ($p < 0.05$, Tab. 7). Auch in der kortikalen Platte fand sich eine hohe Konzentration von unreifen Astrozyten im Vergleich zur Intermediärzone und Subventrikulärzone bei den Kontrolltieren ($p < 0.05$, Tab. 7), was darauf hinweisen könnte, dass es erst im Zielgebiet der Migration unreifer Astrozyten zu einer

Differenzierung kommt. Bei den Kontrolltieren war die niedrigste Konzentration von unreifen Astrozyten in der Intermediärzone zu finden ($p < 0.05$, Tab. 7).

In der Subventrikulärzone führte 30% mütterliche Nahrungsrestriktion zu einer Reduktion von unreifen Astrozyten um 65.5% ($p < 0.01$, Tab. 7, Abb. 12). Keine Veränderungen der unreifen Astrozyten zeigten sich in der Intermediärzone und der kortikalen Platte nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30% (Tab. 7).

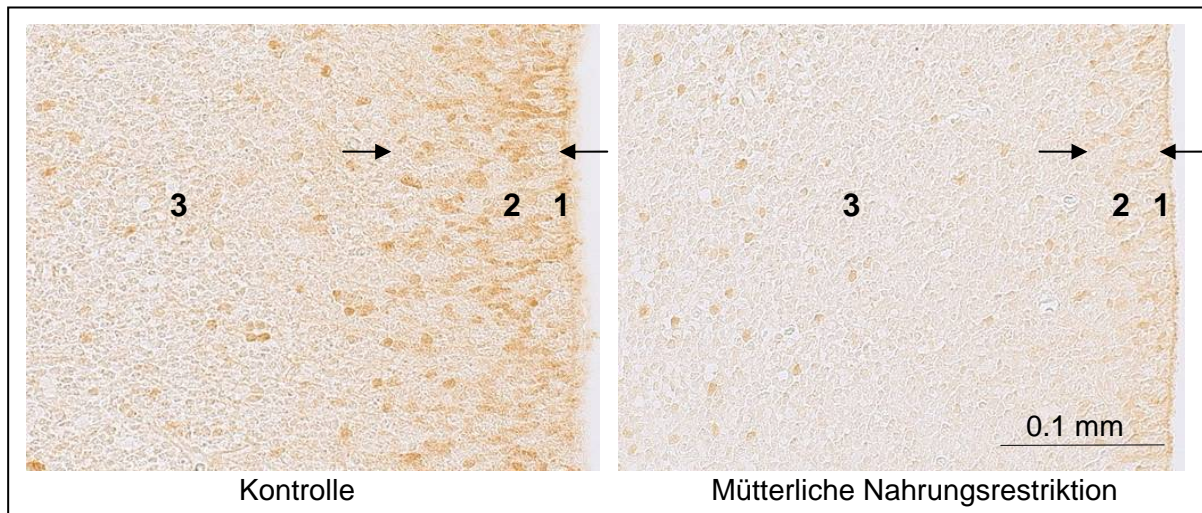


Abb. 12 Effekt von 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Gliogenese in der Subventrikulärzone (S-100 β).

Deutlich ist die geringere Zahl unreifer Astrozyten (mit braunem Präzipitat markierte Zellen) in der schmaleren Subventrikulärzone (Pfeile) nach mütterlicher Nahrungsrestriktion sichtbar beispielhaft im Vergleich zu einem Kontrolltier. 1 Ventrikulärzone 2 Subventrikulärzone 3 Intermediärzone.

	Kontrolle (n=8)	Mütterliche Nahrungsrestriktion (n=6)
S-100β (unreife Astrozyten)	Markierte Fläche in mm² x 10⁻²	
Subventrikulärzone	1,97 \pm 0,28 [§]	0,68 \pm 0,39*
Intermediärzone	0,73 \pm 0,17	0,91 \pm 0,14
Kortikale Platte	1,04 \pm 0,24 ^{&}	1,16 \pm 0,54
GFAP (reife Astrozyten, radiale Gliazellen)		
Subventrikulärzone	2,47 \pm 0,97	1,79 \pm 0,43
Intermediärzone	3,20 \pm 0,84 [§]	3,22 \pm 0,53 [§]
Kortikale Platte	0,84 \pm 0,41	0,77 \pm 0,20

Tab. 7 Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die gliale Reifung im Vergleich zu den Kontrolltieren. MW \pm SEM; * $p < 0.05$ im Vergleich zu den Kontrollen; [§] $p < 0.05$ jeweils im Vergleich zur Intermediärzone und kortikalen Platte, [&] $p < 0.05$ jeweils im Vergleich zur Intermediärzone und Subventrikulärzone, [§] $p < 0.05$ jeweils im Vergleich zur Subventrikulärzone und kortikalen Platte.

Typisch für die radialen Gliazellen, deren Zellkörper in der Subventrikulärzone liegen, sind deren lange Fortsätze, die sich über die gesamte Breite des fetalen Gehirns erstrecken (Abb.

13). Vereinzelte GFAP- immunreaktive Zellen mit einigen sternförmigen Verzweigungen, die reife Astrozyten mit wachsenden Fortsätzen darstellen, wurden in der kortikalen Platte, der Intermediärzone, jedoch nicht in der Subventrikulärzone gefunden (Abb. 13).

Das hohe Vorkommen von GFAP- immunreaktiven Zellen in der Subventrikulärzone spiegelt wahrscheinlich den Gehalt „reifer“ radialer Gliazellen in der Subventrikulärzone wider, da Astrozyten aus der Subventrikulärzone weg migrieren (Tab. 7).

In beiden Gruppen waren die meisten reifen Astrozyten und radialen Gliazellen in der Intermediärzone im Vergleich zur Subventrikulärzone und der kortikalen Platte nachweisbar ($p < 0.05$, Tab. 7, Abb. 13). Mütterliche Nahrungsrestriktion von 30% führte zu keiner Beeinflussung radialer Gliazellen und reifer Astrozyten in den untersuchten Zonen des fetalen Primatengehirns (Tab. 7).

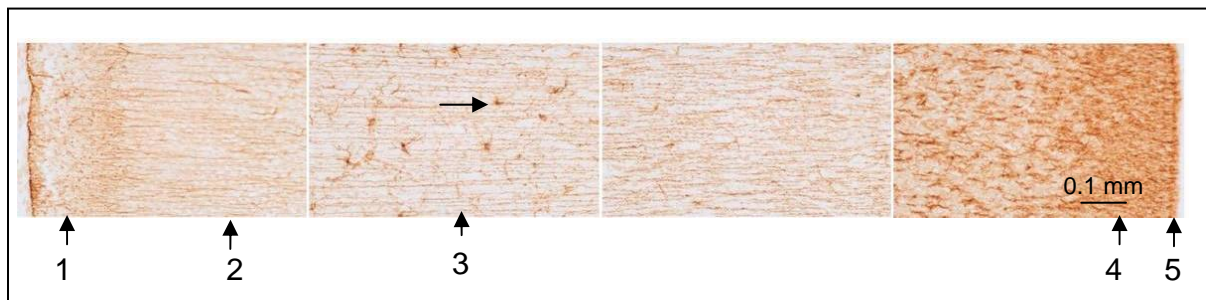


Abb. 13 Reife Astrozyten und radiale Gliazellen (GFAP) und ihr Vorkommen in der gesamten zerebralen Wand. Abgebildet sind die radialen Gliazellen, markiert mit GFAP beispielhaft bei einem Kontrolltier, deren Fortsätze (braunes Präzipitat) sich über die gesamte Breite des fetalen Primatengehirns erstrecken. In der Intermediärzone und der kortikalen Platte sind reife Astrozyten (braune Zellen) mit sternförmigen Verzweigungen zu sehen (Pfeil). 1 Kortikale Platte (außen); 2 Kortikale Platte (innen); 3 Intermediärzone; 4 Subventrikulärzone; 5 Ventrikulärzone.

Die Bestimmung des Reifegrades von Astrozyten ist in Tabelle 2 (Kapitel 4.5.2.3) verdeutlicht worden. Der Reifegrad der Astrozyten, angezeigt durch die Anzahl der Verzweigungen bzw. den hierfür entwickelten Score, ist in beiden Gruppen in der kortikalen Platte höher als in der Intermediärzone ($p < 0.05$, Tab. 8). In der Intermediärzone weisen die Zellen in beiden Gruppen durchschnittlich eine Verzweigung 1. Ordnung auf und in der kortikalen Platte sind es durchschnittlich vier Verzweigungen 1. Ordnung mit Verzweigungen zweiter Ordnung ($p < 0.05$, Tab. 8), was auch im hohen Verhältnis des Scores zur Bewertung des Reifegrades der Astrozyten zwischen der kortikalen Platte und der Intermediärzone zum Ausdruck kommt. Dies bedeutet, dass Astrozyten in der Intermediärzone unreifer als in der kortikalen Platte sind (Tab. 8).

Sowohl die Zahl der Astrozyten, als auch der Score für den Reifegrad der Astrozyten zeigten keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30% (Tab. 8).

	Kontrolle (n=8)	Mütterliche Nahrungsrestriktion (n=6)
Intermediärzone		
Zahl der Astrozyten	6 ± 2,75	6,5 ± 2
Score zur Bewertung des Reifegrades der Astrozyten	1,36 ± 0,47	1,83 ± 0,56
Kortikale Platte		
Zahl der Astrozyten.	9 ± 3	8,33 ± 2,78
Score zur Bewertung des Reifegrades der Astrozyten	4,13 ± 0,69 [§]	4,17 ± 0,89 [§]
Verhältnis (Kortikale Platte/Intermediärzone)		
Zahl der Astrozyten	2,03 ± 0,82	1,54 ± 0,73
Score zur Bewertung des Reifegrades der Astrozyten	3,25 ± 0,81	2,47 ± 0,54

Tab. 8 Zellzahl und Reifegrad der Astrozyten (bestimmt anhand der Zahl der Verzweigungen) in der Kontrollgruppe und nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion. MW±SEM; * p<0.05 im Vergleich zu den Kontrollen; [§] p<0.05 im Vergleich zur Intermediärzone.

5.3.5 Entwicklung des neuronalen Netzwerkes

Zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer haben die neokortikalen Neurone begonnen Fortsätze zu formen und ein neuronales Netzwerk zu bilden, welches deutlich nach der Silberimprägnation sichtbar wurde (Abb. 14).

In der Intermediärzone zeigten sich keine Veränderungen nach mütterlicher Nahrungsrestriktion bei der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes (Tab. 9). In der inneren kortikalen Platte waren die neuronalen Fortsätze nach mütterlicher Nahrungsrestriktion im Vergleich zu den Kontrolltieren auf 64.7% vermindert (p<0.05, Tab. 9, Abb. 14). Die neuronalen Fortsätze in der inneren kortikalen Platte waren auch im Vergleich zur äußeren kortikalen Platte bei den Tieren nach mütterlicher Nahrungsrestriktion signifikant vermindert (p<0.05, Tab. 9).

In der äußeren kortikalen Platte führte mütterliche Nahrungsrestriktion zu keinen Veränderungen bei der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes (Tab. 9).

	Kontrolle (n=8)	Mütterliche Nahrungsrestriktion (n=6)
Silberimprägnation	Markierte Fläche in mm² x 10⁻²	
Intermediärzone	1,9 ± 0,31	1,44 ± 0,49
Innere kortikale Platte	1,9 ± 0,33	1,23 ± 0,50* [§]
Äußere kortikale Platte	2,09 ± 0,25	1,95 ± 0,17

Tab. 9 Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Entwicklung des neuronalen Netzwerkes im Vergleich zu den Kontrolltieren. MW±SEM; * p<0.05 im Vergleich zu den Kontrollen; § p<0.05 im Vergleich zur äußeren kortikalen Platte.

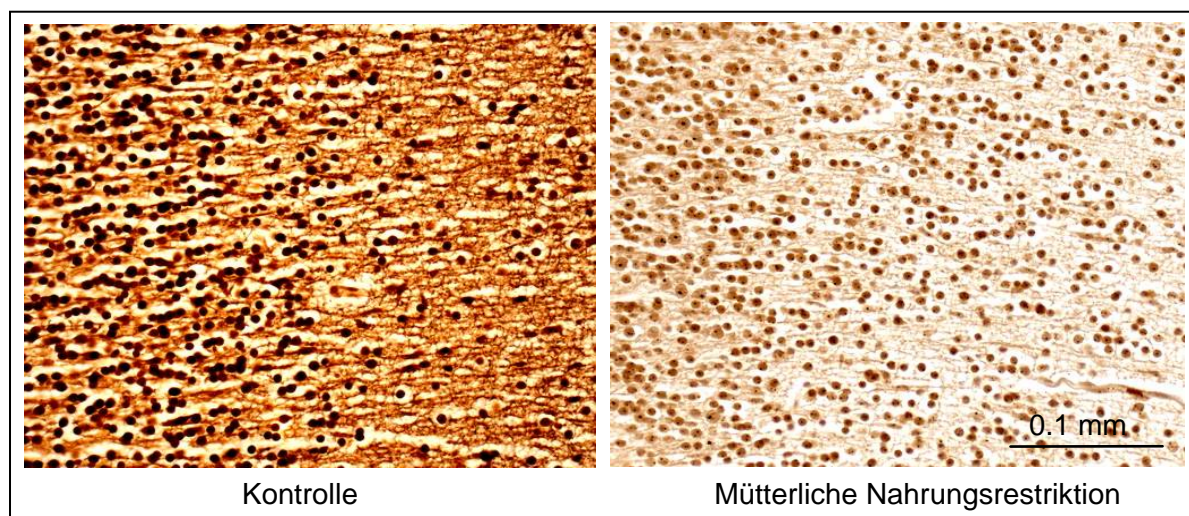


Abb. 14 Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Neuritendichte in der inneren kortikalen Platte (Silberimprägnation).

Abgebildet ist die innere kortikale Platte, sowie die mit einem braunen Präzipitat markierten neuronalen Fortsätze und den dunkel gefärbten Zellkörpern beispielhaft bei einem Kontrollfeten und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30%, die zu einer Abnahme der Neuritendichte führte.

5.3.6 Myelinisierung

In der kortikalen Platte begann zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer die Myelinisierung in den großen neuronalen Fortsätzen, dargestellt durch die Levanol-Färbung (Abb. 15). In der Subventrikulärzone wurde keine Myelinisierungsaktivität, sowohl bei den Kontrolltieren, als auch bei den Feten nach mütterlicher Nahrungsrestriktion gefunden. In der inneren kortikalen Platte war in beiden Gruppen die Myelinisierung jeweils im Vergleich zur kortikalen Platte und Intermediärzone am weitesten fortgeschritten (p<0.05, Tab. 10).

In der inneren kortikalen Platte war die Myelinisierung im Vergleich zur Kontrollgruppe nach mütterlicher Nahrungsrestriktion auf 41.0% reduziert, jedoch immer noch am weitesten fortgeschritten im Vergleich zu den andern Hirnregionen (p<0.05, Tab. 10, Abb. 15). In der

Intermediärzone und der äußeren kortikalen Platte zeigten sich keine Veränderungen der Myelinisierung nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30% (Tab. 10).

	Kontrolle (n=8)	Mütterliche Nahrungsrestriktion (n=6)
Levanol	Markierte Fläche in mm² x 10⁻²	
Intermediärzone	1,58 ± 0,27	1,50 ± 0,35
Innere kortikale Platte	7,6 ± 3,76 ^{\$}	3,12 ± 2,25* ^{\$}
Äußere kortikale Platte	1,32 ± 0,49	1,27 ± 0,27

Tab.10 Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Myelinisierung im Vergleich mit den Kontrolltieren. MW±SEM; * p<0.05 im Vergleich zu den Kontrollen; ^{\$} p<0.05 jeweils im Vergleich zur äußeren kortikalen Platte und Intermediärzone.

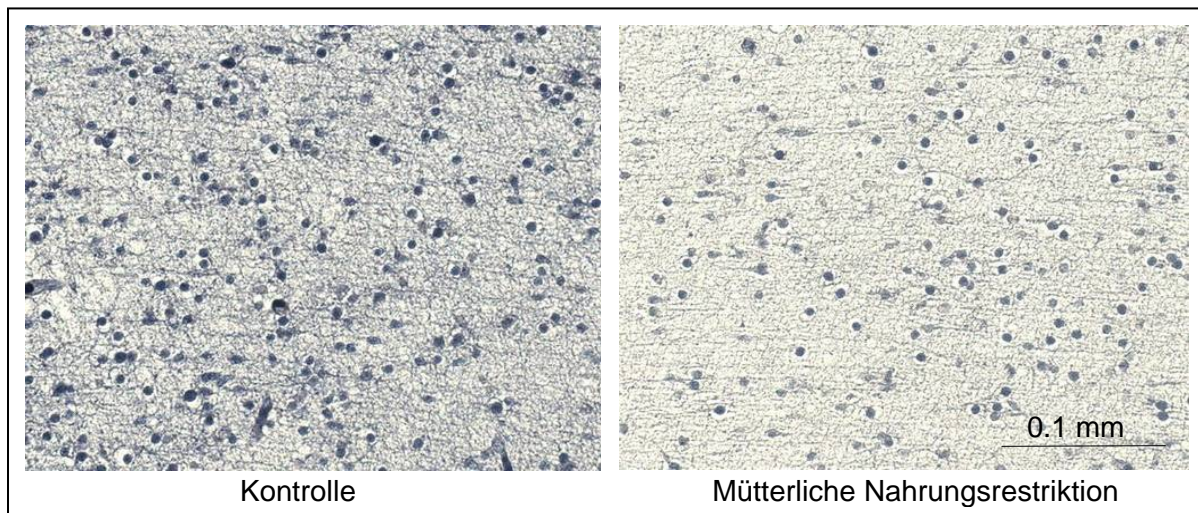


Abb. 15 Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die Myelinisierung (Levanol) in der kortikalen Platte.

Abgebildet ist die innere kortikale Platte mit der beginnenden Myelinisierung der großen neuronalen Fortsätze, die hier mit einem blauen Präzipitat markiert sind, beispielhaft bei einem Kontrollfeten und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion. Die Zellkörper sind ebenfalls mit einem blauen Präzipitat markiert. 30% mütterliche Nahrungsrestriktion führte zu einer Reduktion der Myelinisierung von neuronalen Fortsätzen in der inneren kortikalen Platte.

5.3.7 Glukokortikoidrezeptoren

Bereits zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer fanden sich sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Feten nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion Glukokortikoidrezeptoren, hauptsächlich in den Zellkernen der Neurone und Gliazellen der Subventrikulärzone, der Intermediärzone und der kortikalen Platte (Abb. 16).

Mütterliche Nahrungsrestriktion von 30% führte in der Intermediärzone zu einem Anstieg der Glukokortikoidrezeptoren um 46,5% (p<0.05, Tab. 11, Abb. 16).

Keine Veränderungen ergaben sich in der kortikalen Platte und der Subventrikulärzone nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion (Tab. 11).

	Kontrolle (n=8)	Mütterliche Nahrungsrestriktion (n=6)
Glukokortikoidrezeptoren	Markierte Fläche in $\text{mm}^2 \times 10^{-2}$	
Subventrikulärzone	1,38 \pm 0,88	1,17 \pm 0,91
Intermediärzone	0,85 \pm 0,18	1,24 \pm 0,17*
Kortikale Platte	1,59 \pm 0,36	1,64 \pm 0,34

Tab.11 Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf Glukokortikoidrezeptoren im Vergleich mit der Kontrollgruppe. MW \pm SEM; * p<0.05 im Vergleich zu den Kontrollen.

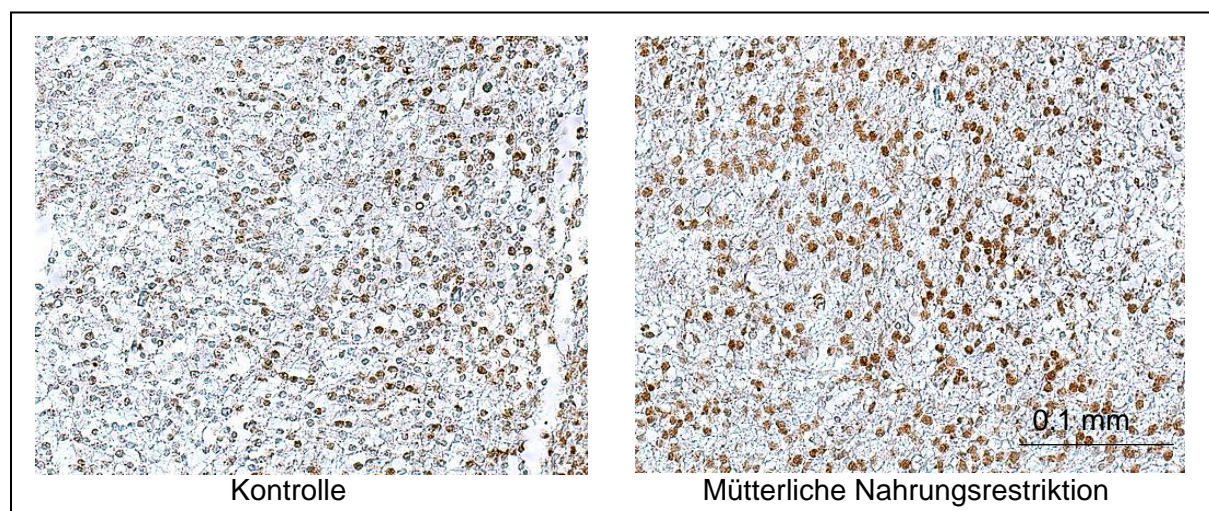


Abb. 16. Effekte von 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion auf Glukokortikoidrezeptoren in der Intermediärzone.

Abgebildet ist die Intermediärzone, sowie die mit einem braunen Präzipitat markierten Glukokortikoidrezeptoren, beispielhaft bei einem Kontrollfeten und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion. Glukokortikoidrezeptoren waren hauptsächlich in den Zellkörpern nachweisbar und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion in der Intermediärzone erhöht (Tab. 11).

5.3.8 Neuronale Zytoskelettproteine

Zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer waren MAP1B und MAP2a,b in der Intermediärzone und der kortikalen Platte nachweisbar (Tab. 12). Die MAP1B und MAP2a,b IR trat vor allem in den neuronalen Fortsätzen und den Zellkörpern auf (Abb. 17, Abb. 18).

In der kortikalen Platte war die MAP1B IR in der Kontrollgruppe am höchsten exprimiert, im Vergleich zu der Intermediärzone und der Subventrikulärzone (p<0.05, Tab. 12). Nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30% zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Veränderungen der IR von MAP1B in den untersuchten Regionen (Tab. 12, Abb. 17).

Die MAP2a,b IR war, wie die MAP1B IR, am stärksten in der kortikalen Platte bei den Kontrolltieren im Vergleich zur Intermediärzone und der Subventrikulärzone ausgeprägt ($p < 0.05$, Tab. 12). Mütterliche Nahrungsrestriktion von 30% veränderte die MAP2a,b IR in den untersuchten Regionen nicht (Tab. 12, Abb. 18).

Die hohe IR von MAP 1B und MAP2a,b in der kortikalen Platte spiegelt die höhere Neuronenzahl in dieser Region wider, was auch durch die hohe IR von mit Doublecortin und NeuN markierten unreifen und reifen Neuronen in der kortikalen Platte belegt wird (Kapitel 5.3.3).

	Kontrolle (n=8)	Mütterliche Nahrungsrestriktion (n=6)
MAP 1B	Markierte Fläche in $\text{mm}^2 \times 10^{-2}$	
Subventrikulärzone	0,53 \pm 0,40	0,48 \pm 0,37
Intermediärzone	0,45 \pm 0,07	0,45 \pm 0,09
Kortikale Platte	1,32 \pm 0,46 ^s	1,00 \pm 0,74
MAP2a,b		
Subventrikulärzone	0,39 \pm 0,36	0,47 \pm 0,45
Intermediärzone	0,38 \pm 0,37	0,57 \pm 0,50
Kortikale Platte	1,44 \pm 0,85 ^s	1,01 \pm 0,93

Tab. 12 Vorkommen neuronaler Zytoskelettproteine bei den Kontrolltieren und nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion. MW \pm SEM; * $p < 0.05$ im Vergleich zu den Kontrollen; ^s $p < 0.05$ jeweils im Vergleich zur Subventrikulärzone und Intermediärzone.

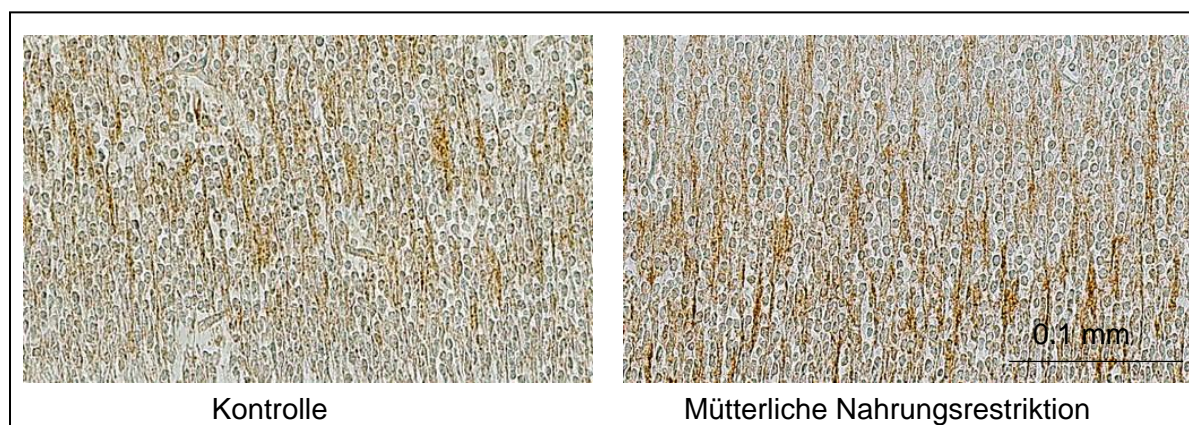


Abb. 17. MAP1B IR in der kortikalen Platte beispielhaft bei den Kontrolltieren und den Feten nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion. Die MAP1B IR (braunes Präzipitat), ist hauptsächlich in den neuronalen Fortsätzen sichtbar. Es zeigten sich keine Unterschiede nach mütterlicher Nahrungsrestriktion.

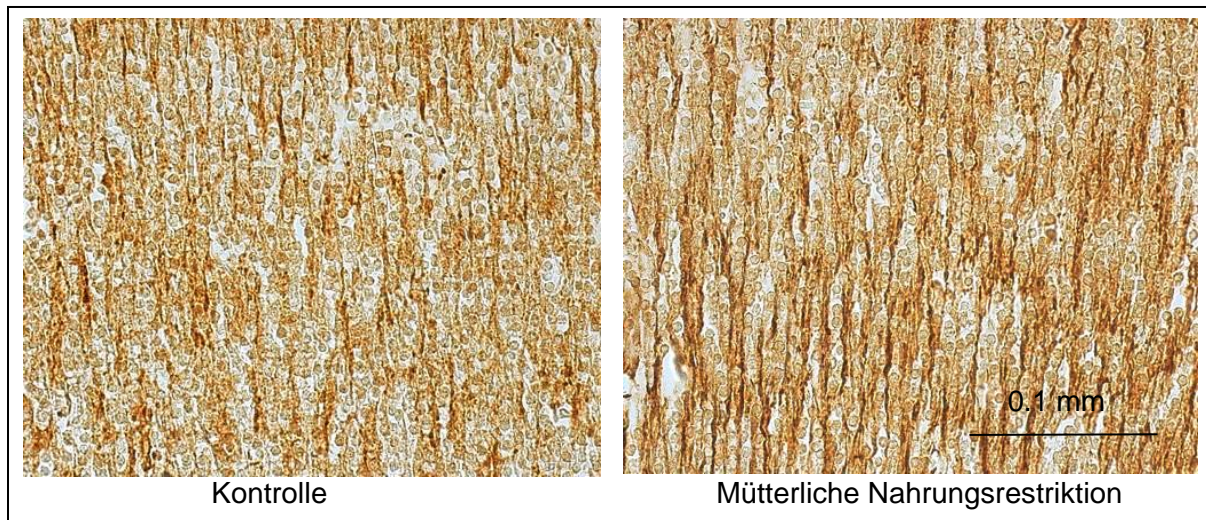


Abb. 18 MAP2a,b IR in der kortikalen Platte beispielhaft bei den Kontrolltieren und den Feten nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion. Die MAP2a,b IR (braunes Präzipitat) ist hauptsächlich in den neuronalen Fortsätzen und Zellkörpern sichtbar. Es zeigten sich keine Unterschiede nach mütterlicher Nahrungsrestriktion.

5.3.9 Glukosetransportproteine 1 und 3

Die Glukosetransportproteine 1 und 3 (GLUT1 und 3) waren jeweils in der Subventrikulärzone, der Intermediärzone und der kortikalen Platte nachweisbar (Tab. 13, Abb. 19-24).

GLUT1, welches hauptsächlich von Endothelzellen und Gliazellen exprimiert wird und eines der Haupttransportproteine der Blut- Hirn- Schranke darstellt, war zwar in beiden Gruppen nachweisbar, jedoch in den untersuchten Regionen nur gering exprimiert (Tab. 13, Abb. 19-21). Die GLUT1 IR war bei den Kontrolltieren in der Intermediärzone im Vergleich zur kortikalen Platte deutlich geringer ausgeprägt ($p < 0.05$, Tab. 13). Mütterliche Nahrungsrestriktion von 30% führte zu keinen Veränderungen bei der GLUT1 IR zwischen beiden Gruppen (Tab. 13, Abb. 19-21).

GLUT3 wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert und war in allen untersuchten Hirnregionen und in beiden Gruppen nachweisbar (Tab. 13, Abb. 22-24). Bei den Kontrolltieren war GLUT3 in der Intermediärzone deutlich weniger exprimiert als in der kortikalen Platte ($p < 0.05$, Tab. 13, Abb. 22-24). Mütterliche Nahrungsrestriktion führte zu keinen Veränderungen der IR von GLUT3 (Tab. 13, Abb. 22-24).

Die geringe Ausprägung der IR von GLUT1 und GLUT3 in der Intermediärzone in beiden Gruppen spiegelt zum einen wahrscheinlich die geringere Vaskularisation der weißen Substanz wider, da GLUT1 spezifisch in der Blut- Hirn- Schranke vorkommt, und weist

andererseits auf eine niedrigere Zahl von Neuronen in der Intermediärzone hin, da GLUT3 spezifisch in Neuronen exprimiert wird. Dies wird auch durch die niedrige IR von NeuN und Doublecortin in der Intermediärzone gezeigt (Kapitel 5.3.3).

	Kontrolle (n=8)	Mütterliche Nahrungsrestriktion (n=6)
GLUT1	Markierte Fläche in mm² x 10⁻²	
Subventrikulärzone	0,18 ± 0,12	0,16 ± 0,09
Intermediärzone	0,07 ± 0,03 [§]	0,09 ± 0,03
Kortikale Platte	0,15 ± 0,06	0,23 ± 0,12
GLUT3		
Subventrikulärzone	0,76 ± 0,33	0,76 ± 0,49
Intermediärzone	0,45 ± 0,34 [§]	0,59 ± 0,17
Kortikale Platte	1,11 ± 0,52	1,12 ± 0,64

Tab. 13 Vorkommen von GLUT1 und 3 bei den Kontrolltieren und nach 30% mütterlicher Nahrungsrestriktion. MW±SEM; * p<0.05 im Vergleich zu den Kontrollen; § p<0.05 im Vergleich zur kortikalen Platte.

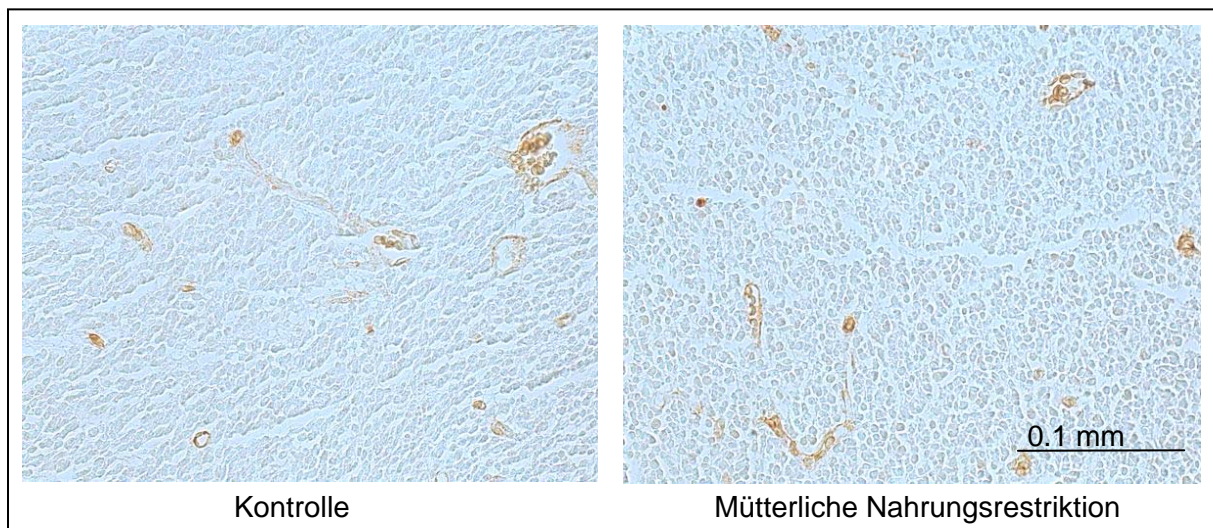


Abb. 19 GLUT1 in der Subventrikulärzone beispielhaft bei den Kontrolltieren und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30%. Die GLUT1 IR (braunes Präzipitat), ist hauptsächlich in Endothelzellen der Kapillaren und Gliazellen zu sehen. Es zeigten sich nach mütterlicher Nahrungsrestriktion keine Veränderungen.

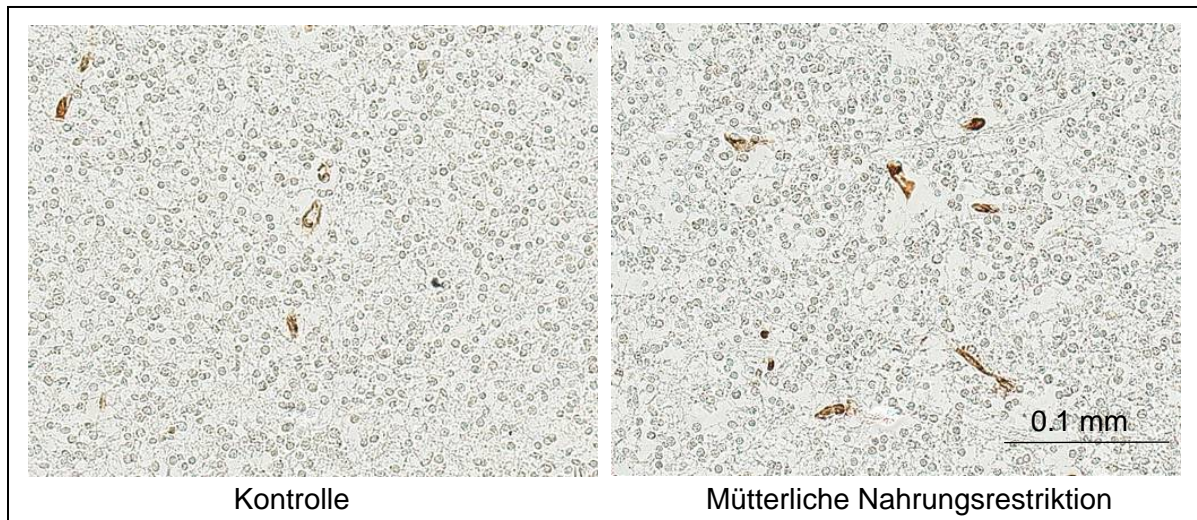


Abb. 20 GLUT1 in der Intermediärzone beispielhaft bei den Kontrolltieren und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30%. Die GLUT1 IR (braunes Präzipitat), ist hauptsächlich in Endothelzellen der Kapillaren und Gliazellen zu sehen. Es zeigten sich nach mütterlicher Nahrungsrestriktion keine Veränderungen.

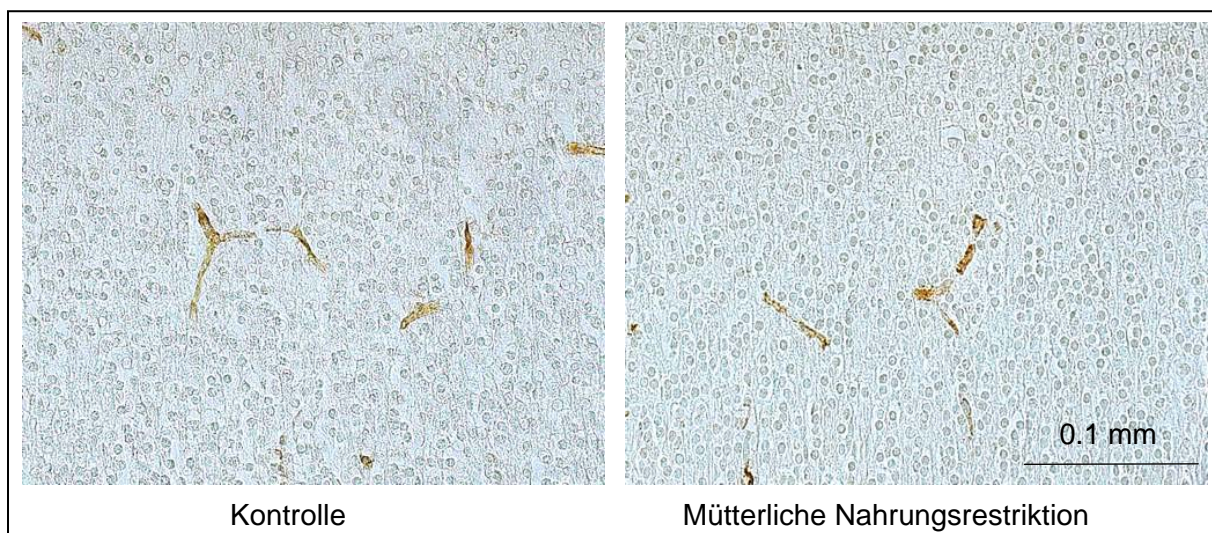


Abb. 21 GLUT1 in der kortikalen Platte beispielhaft bei den Kontrolltieren und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30%. Die GLUT1 IR (braunes Präzipitat) ist hauptsächlich in den Endothelzellen der Kapillaren und Gliazellen zu sehen. Es zeigten sich nach mütterlicher Nahrungsrestriktion keine Veränderungen.

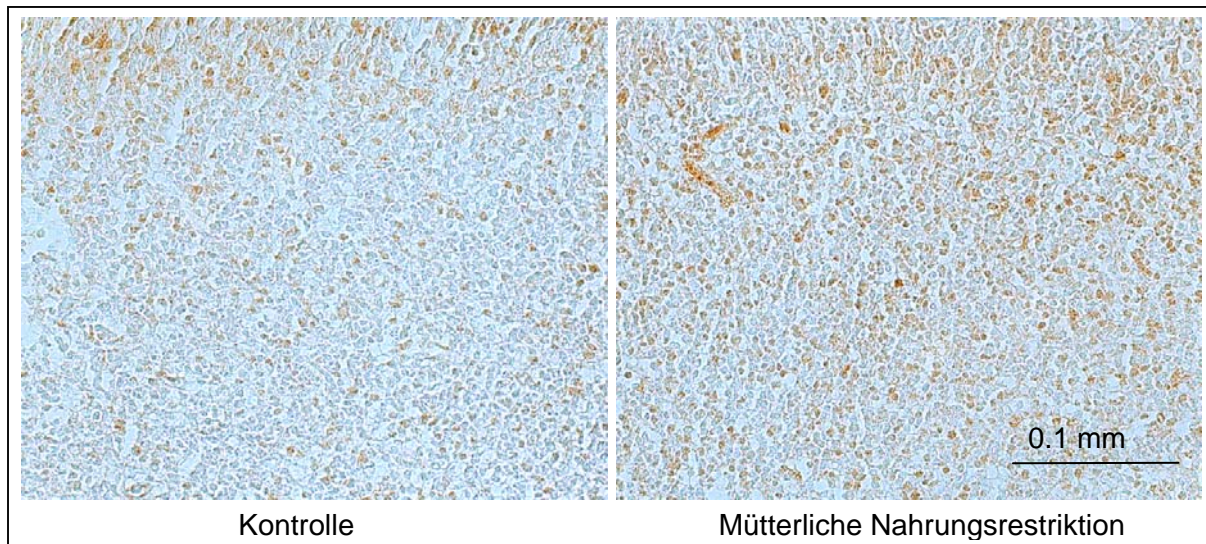


Abb. 22 GLUT3 in der Subventrikulärzone beispielhaft bei den Kontrolltieren und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30%. Die GLUT3 IR (braunes Präzipitat), ist hauptsächlich in den Zellkörpern von Neuronen sichtbar ist. Es zeigten sich nach mütterlicher Nahrungsrestriktion keine Veränderungen.

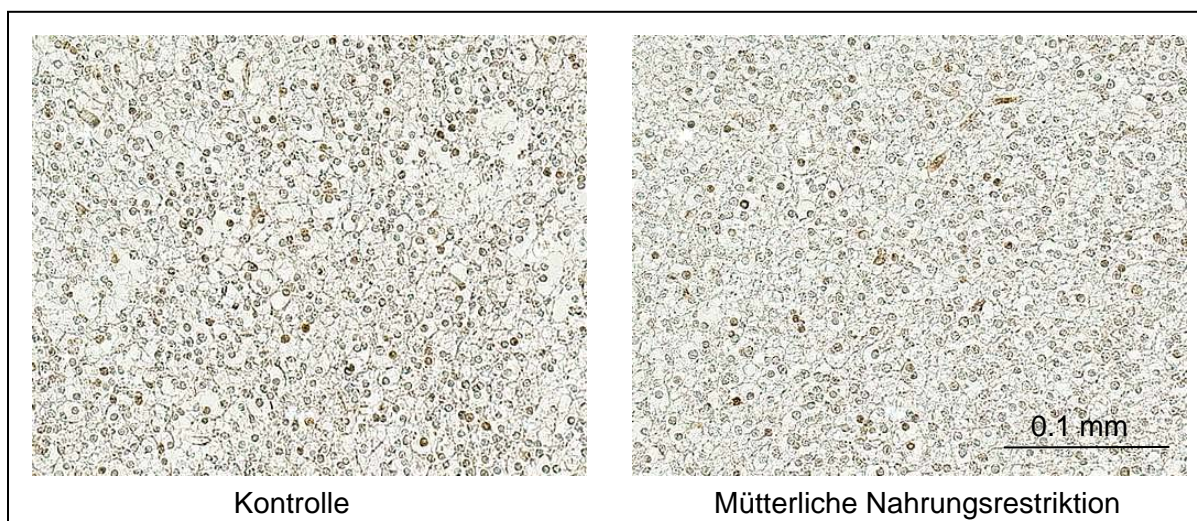


Abb. 23 GLUT3 in der Intermediärzone beispielhaft bei den Kontrolltieren und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30%. Die GLUT3 IR (braunes Präzipitat), ist hauptsächlich in den Zellkörpern von Neuronen sichtbar ist. Es zeigten sich nach mütterlicher Nahrungsrestriktion keine Veränderungen.

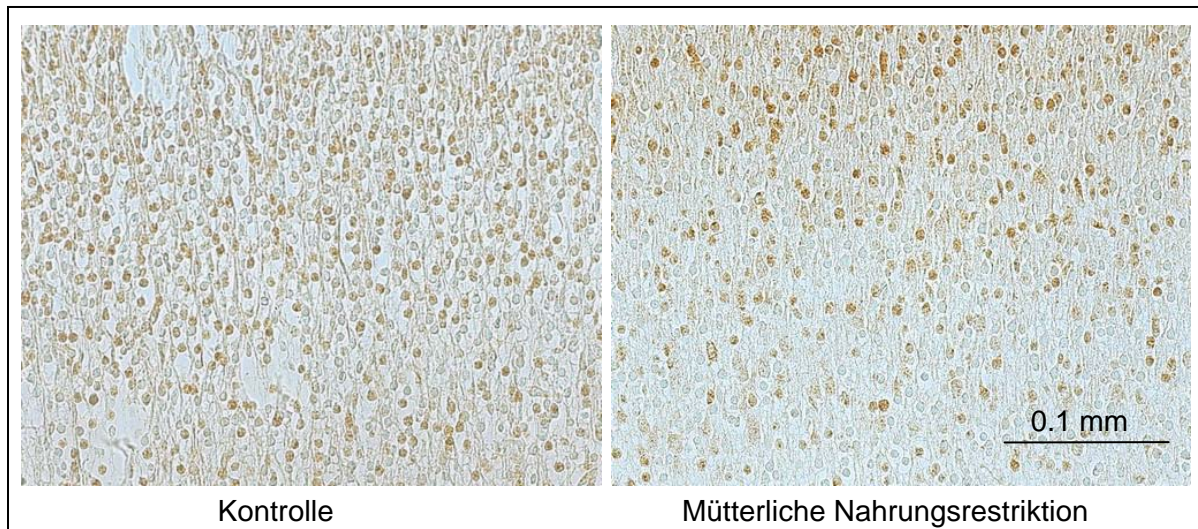


Abb. 24 GLUT3 in der kortikalen Platte beispielhaft bei den Kontrolltieren und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion von 30%. Die GLUT3 IR (braunes Präzipitat), ist hauptsächlich in den Zellkörpern von Neuronen sichtbar ist. Es zeigten sich nach mütterlicher Nahrungsrestriktion keine Veränderungen.

6. Diskussion

6.1. Methodische Betrachtungen

6.1.1 Unterernährungsmodell

Um die Auswirkungen mütterlicher Nahrungsrestriktion auf den Menschen abschätzen zu können und mögliche Erklärungen für die gestörte postnatale kognitive Entwicklung bei niedrigem Geburtsgewicht beim Menschen zu finden (Matte et al. 2001, Richards et al. 2002), führten wir unsere Untersuchungen an nicht- menschlichen Primaten durch.

Zur Untersuchung von mütterlicher Nahrungsrestriktion kommen verschiedene Unterernährungsmodelle zur Anwendung. Experimentelle Studien zur Nahrungsrestriktion liegen bisher hauptsächlich bei Ratten vor. Allerdings ist die direkte Übertragbarkeit von an Ratten gewonnenen Daten auf den Menschen problematisch. Im Gegensatz zum Gehirn von Primaten entwickelt sich das Rattengehirn hauptsächlich nach der Geburt (Morgane et al. 1993). Die Entwicklung vollzieht sich bei Ratten nach kürzerer Trächtigkeit viel schneller und findet hauptsächlich postnatal statt. Nach der Geburt entspricht der Entwicklungsstand bei Ratten etwa dem 7. Schwangerschaftsmonat beim Menschen (Clancy et al. 2001, Morgane et al. 1993). Aufgrund des unterschiedlichen Zeitverlaufs der intrauterinen Entwicklung führt mütterliche Nahrungsrestriktion deshalb potentiell auch zu anderen Auswirkungen auf die Hirnentwicklung bei Nagern und Primaten. So unterscheidet sich auch die Empfindlichkeit auf Umwelteinflüsse zwischen Ratten und Primaten während der fetalen Entwicklung (McMillen & Robinson 2005).

Bisher existieren Modelle, die eine reine Proteinmangelernährung benutzten (Cheek et al. 1976, Lister et al. 2005, Morgane et al. 2002 & 1993, Riopelle et al. 1975, Gressens et al. 1997, Resnick et al. 1979, Barreto-Medeiros et al. 2004, Steiger et al. 2003). Hierbei wurde die normale Proteinzufuhr der Primaten bis auf 25% reduziert (Cheek et al. 1976, Riopelle et al. 1975). Auch bei Ratten wurde das Modell der Proteinmangelernährung angewandt (Lister et al. 2005, Morgane et al. 2002 & 1993, Gressens et al. 1997, Resnick et al. 1979, Barreto-Medeiros et al. 2004, Steiger et al. 2003) und die Proteinzufuhr bis auf 25% reduziert, wobei die jeweilige Diät *ad libitum* zur Verfügung stand, so dass die genau aufgenommene Futtermenge nicht kontrolliert werden konnte. Im Gegensatz zu diesen Studien konnte die aufgenommene Futtermenge in unserer Studie exakt kontrolliert werden, da die Fütterung in Einzelkäfigen stattfand und die jeweilige Futtermenge vorbestimmt wurde.

Außerdem existiert noch ein Modell, das eine globale Mangelernährung bei Ratten verwendet, also eine Restriktion aller Nahrungsbestandteile (Lesage et al. 2001, Royland et al. 1992, Fuller & Wiggins 1984, Fuller et al. 1984, Wiggins et al. 1984b). Bei Ratten wurde dies durch Restriktion der Gesamtfuttermenge bis auf 50% erreicht (Lesage et al. 2001) bzw. bei postnatalen Untersuchungen durch Vergrößerung der Anzahl von Jungtieren, die einem Muttertier zugeordnet wurden (Royland et al. 1992), oder durch Trennung der Jungtiere von der Mutter für eine bestimmte Zeit (Fuller & Wiggins 1984, Fuller et al. 1984, Wiggins et al. 1984b), was jedoch im Gegensatz zu unserer Studie nicht zu einer exakt gleichen Mangelernährung bei jedem Tier führte.

Beim Primaten wurde eine globale Mangelernährung durch Verdünnung der Kontrolldiät, die aus einer Milchnahrung bestand, in einem Verhältnis von bis zu 1:3 erreicht (Kerr et al. 1970) oder bei pränatalen Untersuchungen durch Verminderung der gesamten Kalorienzufuhr der Mutter (Cheek et al. 1976). Im Gegensatz zu unserer Studie, fand die Fütterung in den beiden letzt genannten Studien nicht kontrolliert statt, sondern den Tieren wurde die jeweilige Diät angeboten, die tatsächliche Futtermenge kann damit von Tier zu Tier variieren.

Meines Wissens nach gibt es kein Modell der moderaten Mangelernährung mit Kontrolle der Nahrungseinfuhr, weder bei Ratten noch bei Primaten, wie in unserer Studie durchgeführt.

In unserer Studie wurde eine milde globale Mangelerernährung von 30% gewählt, wie sie auch in Industrienationen relevant ist (Bradley & Corwyn 2002). Eine konstante Unterernährung wurde durch die Fütterung in Einzelkäfigen gewährleistet, welche somit nicht durch andere Tiere vermindert bzw. gestört wurde, während die übrige Haltung der Tiere in der Gruppe erfolgte (Schlabritz-Loutsevitch et al. 2004a). Dieses System erlaubte eine Kontrolle und Manipulation der Futteraufnahme (Schlabritz-Loutsevitch et al. 2004a). Die weiblichen Paviane konnten in der Gruppenhaltung belassen werden und dadurch eine normale soziale und körperliche Aktivität beibehalten, wie es bei einer Isolation in individuellen Käfigen nicht der Fall ist (Cheek et al. 1976). So konnten isoliert die Effekte einer mütterlichen Mangelernährung in einem der natürlichen Lebensweise der Tiere entsprechendem sozialen Umfeld untersucht werden. Unser Modell der Unterernährung wurde deshalb im Gegensatz zu anderen Studien, die in Einzelkäfigen ohne soziale Kontakte der Tiere untereinander stattfanden (Cheek et al. 1976), nicht durch soziale Isolation der Tiere beeinträchtigt und erlaubt dennoch eine kontrollierte Nahrungszufuhr. Die verringerte globale Nahrungszufuhr für den Feten spiegelt auch andere Ursachen einer intrauterinen Wachstumsrestriktion, wie z. B. plazentare Insuffizienz, wider. Eine Plazentainsuffizienz kann tatsächlich ähnliche Effekte

auf das sich entwickelnde menschliche Gehirn wie eine mütterliche Mangelerkrankung hervorrufen (Edwards et al. 2001, Rees & Harding 2004).

Der Zeitpunkt und die Dauer der Mangelerkrankung variierten in den mir bekannten Studien zur Untersuchung von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die fetale neuronale Entwicklung. Beim Primaten wurde die Dauer einer pränatalen Mangelerkrankung vom 30. Tag der Gestation bis zur Geburt (Cheek et al. 1976, Riopelle et al. 1975, Riopelle & Favret 1977, Hillman et al. 1974) durchgeführt, oder fand postnatal durch direkte Nahrungsrestriktion der Jungtiere bis zum 7. Monat statt (Kerr et al. 1970). Meines Wissens nach existiert keine Studie, die die Effekte einer pränatalen Nahrungsrestriktion in der ersten Hälfte der Gestation beim Primaten und Ratten untersucht. Aufgrund der schlechten Datenlage ist diese Arbeit zur Untersuchung des Einflusses von kontrollierter globaler mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die fetale Gehirnentwicklung in der frühen Gestation bei nicht- humanen Primaten deshalb meines Wissens nach die einzige und von besonderer Bedeutung. Wir haben für den Zeitpunkt der mütterlichen Nahrungsrestriktion die erste Hälfte der Gestation gewählt, da sich zu diesem Zeitpunkt die Grundstrukturen des neuronalen Netzwerkes entwickeln (Hendrickx & Peterson 1997). Weiterhin findet zu dem gewählten Untersuchungszeitpunkt die Zellproliferation und programmierter Zelltod, sowie die Expression der für die zerebrale Morphogenese wichtigen Strukturproteine, die Reifung der Astrozyten, die Myelinisierung und die Entwicklung des neuroglialen Netzwerkes statt. Der Beginn der Nahrungsrestriktion wurde erst am 30. Gestationstag gewählt, da vorher eine besonders hohe Abortrate zu erwarten gewesen wäre (Hendrickx & Peterson 1997).

6.1.2 Verwendete histochemische und immunhistochemische Färbungen

Alle verwendeten histochemischen und immunhistochemischen Färbungen wurden anhand üblicher Protokolle durchgeführt und ergaben allesamt das jeweilig erwartete spezifische Färbungsmuster. Die mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen dienten der Beurteilung des spezifischen Färbungsmusters.

Die Mehrzahl der benutzten Antikörper sind für menschliches Gewebe spezifisch und führen bei nicht- menschlichen Primaten ebenfalls zu sicheren Ergebnissen, da die Antigenität zwischen nicht- menschlichen und menschlichen Primaten sehr ähnlich ist (Hendrickx & Peterson 1997).

Zellproliferation und programmierter Zelltod

Die Zellproliferation wurde mit dem monoklonalen Antikörper Ki67 nachgewiesen, der alle proliferierenden Zellen beginnend mit der späten G1-, über die gesamte S-, M- und G2- Phase des Zellzykluses markiert (Gerdes et al. 1984b). Dieser Antikörper kann somit in allen für die Zellteilung wichtigen Phasen des Zellzykluses benutzt werden. Ki67 wird routinemäßig zur Markierung einer Vielzahl verschiedener Tumorarten verwendet, wie z.B. von Non- Hodgkin Lymphomen (Gerdes et al. 1984a), verschiedenen ZNS Tumoren (Giangaspero et al. 1987) und Mammakarzinomen (Gerdes et al. 1986). Die Durchführung der Immunmarkierung mit Ki67 war in unserer Studie problemlos möglich und ergab ein braunes Präzipitat der Zellkerne proliferierender Zellen z.B. in der Subventrikulärzone sichtbar (Abb. 7), welches mit den Ergebnissen von Falini et. al. übereinstimmt, die Ki67 in proliferierenden Zellen in verschiedenen menschlichen und tierischen Geweben (Lamm, Kalb, Hund, Kaninchen, Ratte) nachwiesen (Falini et. al. 1989).

Der programmierte Zelltod wurde durch eine etablierte *in situ* Hybridisierung nachgewiesen, die apoptotische Zellen anhand der DNA- Strangbrüche, welche vornehmlich während der Apoptose entstehen, markiert (Gavrieli et al. 1992). Dieses Verfahren erlaubte problemlos die selektive Darstellung apoptotischer Zellen in den untersuchten Hirnregionen, wie in Abb. 8 durch die typische dunkle Markierung der Zellkerne gezeigt.

Neuronale Reifung

Migrierende neuronale Vorläuferzellen wurden mit dem Antikörper gegen Doublecortin problemlos nachgewiesen (Abb. 9, Abb. 10). Doublecortin, ein mikrotubuli- assoziiertes Protein, wird im adulten Gehirn besonders in Gebieten mit kontinuierlicher Neurogenese wie dem Hippokampus und der Subventrikulärzone in verschiedenen Spezies z.B. Mäusen und Ratten exprimiert (Couillard-Despres et al. 2005). Auch zum Nachweis neuronaler Vorläuferzellen im Primatengewebe ist dieser Antikörper ebenfalls etabliert (Reiner et al. 2006). Die überwiegende Markierung von Neuronen in der Subventrikulärzone zeigt die Spezifität von Doublecortin für unreife Neurone auch in unserer Studie. Doublecortin ist deshalb besonders für die Darstellung der Neurogenese während der Hirnentwicklung geeignet.

Die Darstellung reifer Neurone erfolgte in unserer Studie mit dem Antikörper gegen NeuN, welcher zu einem braunen Präzipitat der neuronalen Nuklei führte und war problemlos möglich (Abb. 11). Dieser Antikörper wurde bereits im fetalen menschlichen Gehirn benutzt und führte dort ebenfalls zu einer Färbung vor allem der Nuklei reifer Neurone (Sarnat et al.

1998). Auch beim Primaten ist dieser Antikörper etabliert und wurde bereits zur Darstellung reifer Neurone benutzt (Kuo et al. 2003).

Gliale Reifung

Unreife Astrozyten konnten durch den Antikörper gegen S-100 β , einem Markerprotein für unreife Astrozyten (Burette et al. 1998), mit einem braunen Präzipitat dargestellt werden (Abb. 12). S-100 β ist ein neurotrophes Protein, welches nicht nur in unreifen Astrozyten, sondern auch extrazellulär vorkommt (Van Eldik & Wainwright 2003). Auch beim Primaten wurde S-100 β bereits erfolgreich zur Darstellung von Astrozyten im Nervus optikus eingesetzt (Joos et al. 2003). Das Vorkommen von S-100 β insbesondere in der proliferativ aktiven Subventrikulärzone, wie bereits bei fetalen Mäusen gezeigt (Namiyama et al. 2004), macht seine Spezifität für unreife Astrozyten auch in der vorliegenden Studie höchst wahrscheinlich. Bei der Messung der mit S-100 β markierten Flächen wurden in unserer Studie jedoch nur das intrazelluläre Vorkommen der Markierung in den unreifen Astrozyten durch Veränderungen des Schwellwertes bei der Messung markierter Flächen berücksichtigt, um so Rückschlüsse auf eine Beeinträchtigung der unreifen Astrozyten ziehen zu können. Dies könnte eine mögliche Fehlerquelle darstellen, denn die Veränderungen des Schwellwertes, so dass nur noch das intrazelluläre Vorkommen berücksichtigt wird, bedeutet, dass alle Werte unterhalb dieses Schwellwertes als nicht markiert galten, während die übrigen Grauwerte als immunmarkiert erfasst wurden. Eine exakte Bestimmung bzw. Veränderung dieses Schwellwertes war hier jedoch problematisch und stellt eine potentielle Fehlerquelle dar.

Die Darstellung radialer Gliazellen und reifer Astrozyten mit dem für Primatengewebe etablierten Antikörper gegen GFAP führte bei Rakic 2003 zur Darstellung dieser Zelltypen und auch in unserer Studie kam es zu einer eindeutigen Markierung radialer Gliazellen und reifer Astrozyten (Rakic 2003, Abb. 13). Die Differenzierung von Astrozyten und radialen Gliazellen war aufgrund der charakteristischen Fortsätze der radialen Gliazellen, die sich über die gesamte zerebrale Wand erstreckten, problemlos möglich (Rakic 2003, Abb. 5).

Neuronales Netzwerk

Die Ausbildung des neuronalen Netzwerkes war im vorliegenden fetalen Hirngewebe durch histochemische Methoden nachweisbar. Zur Darstellung des neuronalen Netzwerkes wurde die Silberimprägnation benutzt, welche die neuronalen Fasern mit einem braunen Präzipitat darstellt und sich deshalb besonders zur Darstellung des neuronalen Netzwerkes eignet

(Servier & Munger 1965). Die problemlose Darstellung des neuronalen Netzwerkes zeigt sich auch in den mit einem braunen Präzipitat markierten neuronalen Fortsätzen in Abb. 9 dieser Studie.

Myelinisierung

Die beginnende Myelinisierung wurde mit der Levanol-Färbung nachgewiesen, welche zuverlässig myelinisierte Fasern mit einem blauen Präzipitat darstellt (Böck & Zschiesche 1978). Die mit einem blauen Präzipitat markierten großen neuronalen Fortsätze (Abb. 11) zeigen, dass es in der inneren kortikalen Platte bereits zu diesem Zeitpunkt der Gestation zu einer beginnenden Myelinisierung kommt und dass die Levanol-Färbung auch im fetalen Paviangewebe im vorliegenden Gestationsalter funktioniert.

Glukokortikoidrezeptoren

Der Antikörper für die Markierung der Glukokortikoidrezeptoren war laut Herstellerangaben (Affinity BioReagents, Golden, Colorado, USA) für Primatengewebe nicht getestet. Es wurden deshalb zur Positiv- Kontrolle Rattengehirne, für die der Antikörper spezifisch ist, mitgefärbt und mit der Färbung beim Primaten verglichen, wobei sich keinerlei Unterschiede im Färbungsmuster ergaben. Auch bei anderen Arbeitsgruppen wurde dieser Antikörper bereits erfolgreich am nicht- humanen Primaten an sog. COS- Zelllinien (Fibroblasten von *Cercopithecus aethiops*, nicht- humaner Primat) benutzt und führte zu zuverlässigen positiven Färbeergebnissen (Wyszomierski et al. 1999, Wang et al. 2004, Sackey et al. 1996). Somit konnte die Markierung der Glukokortikoidrezeptoren mit diesem Antikörper am fetalen Paviangehirn in der Subventrikulärzone, der Intermediärzone und der kortikalen Platte ausgewertet werden. Eine Differenzierung zwischen dem Besatz von Glukokortikoidrezeptoren auf Neuronen und Gliazellen ist nicht vorgenommen worden, dies muss in Folgestudien näher untersucht werden.

Neuronale Zytoskelettproteine

Unter der Anwendung moderner immunhistochemischer Methoden war es problemlos möglich, die für die Hirnentwicklung bedeutenden zytoskelettalen Proteine MAP1B und MAP2a,b (Tucker 1990) nachzuweisen, welche bereits beim fetalen Pavian erfolgreich angewendet wurden (Antonow-Schlorke et al. 2003). MAP1B ist das hauptsächlich in der Fetalzeit vorkommende mikrotubuli- assoziierte Protein (Tucker et al. 1988) und ist für die Aussprossung der neuronalen Fortsätze, sowie wahrscheinlich für die Plastizität und

Flexibilität der neuronalen Fortsätze verantwortlich (Tucker 1990). Deshalb war der Nachweis auch in unserer Studie von großer Bedeutung. MAP1B wurde in unserer Studie und auch bei anderen Autoren (Tucker 1990) vor allem in den Axonen, aber auch in allen anderen neuronalen Zellkompartimenten gefunden (Abb. 17).

MAP2 stabilisieren in adulten Neuronen die Mikrotubuli und kommen in 3 Isoformen vor: MAP2a, welches bei Ratten kurz nach der Geburt nachgewiesen wurde und somit zu einem Zeitpunkt der neuronalen Entwicklung, der mit unserer Studie vergleichbar ist und MAP2b, welches kontinuierlich während des gesamten Lebens gefunden wird (Riederer & Matus 1985) und ebenfalls in unserer Studie nachgewiesen werden konnte. Außerdem existiert noch eine dritte Isoform, MAP2c, welches nur während der Gehirnentwicklung exprimiert wird (Tucker 1990). MAP2c trägt zur Stabilisierung von Synapsen, neuronaler Plastizität und der Synaptogenese bei (Gordon-Weeks 1997) und wurde in unserer Studie nicht untersucht, da ein entsprechender einzelner Antikörper nicht für Primaten zu Verfügung stand, sondern nur ein Antikörper gegen MAP2a,b,c, welcher jedoch zu keinem zuverlässigem Färbeergebnis führte und deshalb nicht in die Auswertung einbezogen wurde. MAP2a,b kommt vor allem in Neuriten vor und spielt ebenso eine Rolle für das Neuritenwachstum (Ferreira et al. 1989). In reifen Neuronen wurden alle 3 Isoformen hauptsächlich in Zellkörpern und in den Dendriten gefunden (Matus 1990, Riederer & Matus 1985, Abb. 18).

Auch in unserer Studie war die Darstellung von MAP2a,b und MAP1B problemlos möglich und die IR von MAP2a,b und MAP1B wurde hauptsächlich in den neuronalen Fortsätzen beobachtet (Abb. 17 und 18).

Glukosetransportproteine 1 und 3

Die Glukoseaufnahme in das Gehirn erfolgt über Glukosetransportproteine, welche selektiv in Zellmembranen der Blut- Hirn- Schranke bzw. von Neuronen vorkommen (Maher et al. 1992, Vannucci 1994, Pardridge et al. 1990). Die Darstellung von GLUT1, welches hauptsächlich im Endothel zerebraler Mikrogefäße gefunden wird und Teil der Blut- Hirn- Schranke ist (Pardridge et al. 1990), war problemlos möglich. GLUT1 ist limitierend für die Glukoseaufnahme in das Gehirn (Pardridge et al. 1990). Dieser Antikörper wurde bereits erfolgreich beim fetalen Schaf eingesetzt (Antonow-Schlorke et al. 2006) und ist auch beim Pavian etabliert (Antonow-Schlorke et al. 2007, Cornford et al. 1998). Es zeigte sich die erwartete Braunfärbung der Endothelzellen der Kapillaren (Abb. 19- 21). Auch GLUT3, das vor allem in neuronalen Zellmembranen vorkommt und über welches die Glukoseaufnahme in die Neuronen selektiv erfolgt (Maher et al. 1992, Vannucci 1994), konnte mit dem

verwendeten Antikörper, der bereits mehrfach am Primaten verwendet wurde (Antonow-Schlorke et al. 2006), erfolgreich dargestellt werden. Es ergab sich das erwartete Färbungsmuster (braunes Präzipitat) der Neurone und des Neuropils (Abb. 22- 24).

6.1.3 Quantifizierung der Färbungen

Die Gewichte der Gehirne und die Körpergewichte der Kontrollgruppe und nach mütterlicher Nahrungsrestriktion unterschieden sich nicht. Außerdem wurden durch morphometrische Messungen bestätigt, dass die Gesamtfläche der Gehirne beider Gruppen unverändert war, so dass eine Beurteilung und der Vergleich der Färbungen zwischen beiden Gruppen problemlos möglich war. Weiterhin wurde durch morphometrische Messungen die Breite aller 3 zu untersuchenden Gehirnregionen bestimmt.

Der Stand der Hirnentwicklung zum Untersuchungszeitpunkt wurde bei den Kontrolltieren durch Beurteilung der jeweiligen Hirnregion zum einen in der HE- Färbung, aber auch durch Beurteilung der Hirnregion mit den spezifischen Immunmarkierungen zur Darstellung der neuronalen und glialen Reifung, untersucht.

Die Bewertung der Zellproliferation und des programmierten Zelltodes geschah durch das Zählen von proliferierenden und apoptotischen Zellen in den untersuchten Hirnregionen. Dabei wurden die proliferierenden Zellen in der jeweiligen Region in einem repräsentativen Gesichtsfeld gezählt, da hier aufgrund der hohen Anzahl proliferierender Zellen ein einzelnes Gesichtsfeld ausreichend zur Beurteilung der Anzahl proliferierender Zellen war (Tab. 5). Die apoptotischen Zellen wurden in je 5 Gesichtsfeldern pro untersuchter Hirnregion gezählt, da aufgrund der teilweise sehr geringen Anzahl apoptotischer Zellen pro Gesichtsfeld Fehler durch die Auswahl eines unrepräsentativen Feldes vermieden werden sollten. Aus den 5 untersuchten Gesichtsfeldern pro jeweiliger Hirnregion wurde dann der Mittelwert gebildet.

Die Immunmarkierungen lassen sich nur semiquantitativ auswerten. Die semiquantitative Beurteilung der spezifischen Immunmarkierungen für die neuronale und gliale Reifung geschah durch das Messen der markierten Flächen in einem repräsentativen Ausschnitt der jeweiligen Zone des Primatengehirns mit einem Bildverarbeitungsprogramm (Scion Image 6.23, NIH, USA). Diese Methode zur Beurteilung der glialen und neuronalen Reifung wurde bereits häufig beschrieben und liefert zuverlässige Ergebnisse (Sarnat et al. 1998, Burette et al. 1998, Dayer et al. 2005). Die verwendeten Antikörper färben jeweils exklusiv bestimmte zelluläre Strukturen (NeuN: reife Neurone, Doublecortin: migrierende neuronale Vorläuferzellen, GFAP: radiale Gliazellen und reife Astrozyten) bis auf S-100 β , welches auch

extrazellulär vorkommt (Van Eldik & Wainwright 2003). In unserer Studie wurde das extrazelluläre Vorkommen von S-100 β nicht berücksichtigt und durch Veränderungen der Einstellungen des Bildverarbeitungssystems bei der Messung der markierten Fläche ausgeschlossen. Allerdings ist eine exakte Bestimmung des intrazellulären Vorkommens durch Veränderungen des Schwellwertes problematisch und stellt eine potentielle Fehlerquelle dar.

Die Beurteilung der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes, der beginnenden Myelinisierung, der Glukokortikoidrezeptoren, sowie der zytoskelettalen Proteine MAP1B und MAP2a,b und GLUT1 und 3 geschah ebenso durch Messung der markierten Flächen in einem repräsentativen Ausschnitt der jeweiligen Region des Primatengehirns mit einem Bildverarbeitungsprogramm. Es wurde bei der Messung der markierten Flächen darauf geachtet, dass jeweils eine genügende Anzahl an Neuronen vorhanden war, um eine zuverlässige Auswertung zu ermöglichen. Die gewählte Größe der Bildausschnitte erlaubte uns dabei eine zuverlässige Auswertung der jeweiligen Markierung, da zuvor in jeder der untersuchten Hirnregionen ein repräsentativer Ausschnitt gewählt wurde. Die Zuverlässigkeit der Messungen wird auch in den geringen interindividuellen Streuungen der Messwerte sichtbar. Deshalb war die Wiederholung der Messungen in verschiedenen Ausschnitten nicht nötig.

Als weitere quantifizierende Methode für die Beurteilung der glialen Reifung wurde ein eigenes Bewertungssystem für den Reifegrad der Astrozyten in der Intermediärzone und der kortikalen Platte in der Immunmarkierung mit GFAP entwickelt. Dabei wurden die glialen Fortsätze reifer Astrozyten jeweils in der Intermediärzone und der kortikalen Platte gezählt (siehe Kapitel 4.5.2.3). Die Subventrikulärzone wurde bei dieser Bewertung nicht einbezogen, da zu diesem Zeitpunkt der Gestation in dieser Proliferationszone des fetalen Primatengehirns noch keine reifen Astrozyten, sondern nur radiale Gliazellen vorkommen (Rakic 1971 und 2003). Zu diesem Zeitpunkt der Gestation wurde auch in dieser Arbeit in der Subventrikulärzone durch die Immunmarkierung von GFAP und S-100 β radiale und unreife Astrozyten, jedoch keine reifen Astrozyten, gefunden (Abb. 5 und 13)

6.2. Stand der Hirnentwicklung zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer

Zellproliferation und programmierter Zelltod

Die höchste Anzahl von proliferierenden Zellen wurde in beiden Gruppen in der Subventrikulärzone gefunden. Die höchste Rate von apoptotischen Zellen wurde in beiden

Gruppen in der Intermediärzone gefunden, also während der Zellmigration zum Zielgebiet. Im fetalen Primatengehirn gipfelt die neuronale Proliferation in der Ventrikulär- und Subventrikulärzone zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationszeit (Rakic 1978), welches mit dem hier untersuchten Gestationszeitpunkt und der höchsten Zahl proliferierender Zellen in der Subventrikulärzone übereinstimmt.

Die hohe Rate von proliferativem Zelltod, unabhängig von der mütterlichen Nahrungsrestriktion, in der Intermediärzone weist darauf hin, dass die meisten der neu gebildeten Zellen nicht in der proliferativen Subventrikulärzone eliminiert werden, sondern während der Migration. Es wurde beim fetalen Schaf gezeigt, dass migrierende Zellen und programmierter Zelltod in der weißen Substanz dem zeitlichen Profil von Migration und Zelltod in der proliferativen Subventrikulärzone folgen (Brodhun et al. 2004a). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Studie von Brodhun et al. 2004, zeigten Rakic und Zecevic (2000) bei einer kleinen Anzahl von menschlichen Feten von der 4.5 bis 27. Schwangerschaftswoche, dass in Bezug auf die Gesamtzellzahl, die Anzahl apoptotischer Zellen in der 17. Schwangerschaftswoche ein Maximum in der Subventrikulärzone erreicht und von der 17. bis 21. Schwangerschaftswoche in der Intermediärzone und der kortikalen Platte anhaltend hohe Werte erreicht wurden (Rakic & Zecevic 2000). Im Gegensatz zum proliferativen Zelltod in der Subventrikulärzone und der Intermediärzone stellt die niedrige Rate von programmierten Zelltod in der kortikalen Platte den zielbezogenen Zelltod dar, das heißt, die Beseitigung von überflüssigen Zellen, die nicht angemessen in das sich beginnend entwickelnde neuronale Netzwerk integriert sind (Oppenheim 1991). Deshalb spielt der zielbezogene Zelltod zu diesem Zeitpunkt der Gestation noch keine Rolle und der zeitliche Verlauf des Zelltodes in der kortikalen Platte, einer Zielregion der Migration, folgt nicht dem Zeitverlauf der Proliferation (Brodhun et al. 2004a).

Neuronale Reifung und gliale Reifung

Zum Zeitpunkt der Untersuchung fanden sich in der Subventrikulärzone vor allem unreife Astrozyten und neuronale Vorläuferzellen, sowie radiale Gliazellen, jedoch keine reifen Astrozyten (Abb. 5). Dies zeigt die Bedeutung dieser Zone als fetale Proliferationszone und stimmt mit den Ergebnissen von Rakic überein (Rakic 1978). In der Intermediärzone fanden sich radiale Gliazellen und deren Fortsätze, die sich über die gesamte Breite des fetalen Primatengehirns erstrecken und reife Astrozyten (Rakic 1971). Nur vereinzelt waren unreife Astrozyten sowie unreife neuronale Vorläuferzellen und reife Neuronen in der Intermediärzone zu finden. Reife Astrozyten mit wachsenden Fortsätzen wurden weiterhin

noch in der kortikalen Platte gefunden (Abb. 5). Weiterhin waren in dieser Region des fetalen Primatengehirns unreife Astrozyten und neuronale Vorläuferzellen vorhanden. Außerdem waren zum Zeitpunkt 0.5 der Gestation bereits reife Neurone in der kortikalen Platte vorhanden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Rakic überein, der 1978 die Entwicklung des fetalen Telenzephalons beim Primaten beschrieb und zeigte, dass die Migration bereits zu diesem Zeitpunkt begonnen haben muss (Rakic 1978).

Neuronales Netzwerk und Myelinisierung

Die neokortikalen Neurone haben bereits begonnen Fortsätze zu bilden und ein neuronales Netzwerk war nach Silberimprägnation nachweisbar. Dies steht ebenfalls in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Rakic (Rakic 1978).

Die beginnende Myelinisierung war vor allem in der inneren kortikalen Platte in den großen neuronalen Fortsätzen zu diesem Zeitpunkt der Gestation nachweisbar.

Beim Menschen beginnt die Myelinisierung pränatal und erreicht ihr Maximum in den ersten beiden Lebensjahren (Wiggins 1986). Dabei wurde gezeigt, dass die Myelinisierung in kaudorostrale Richtung fortschreitet, das heißt kaudale Abschnitte wie Medulla oblongata und das Mesenzephalon waren bereits pränatal stärker myelinisiert als rostrale Bereiche (Baumann & Pham-Dinh 2001). Im Kortex des Menschen wurde durch MRT-Aufnahmen gezeigt, dass die Myelinisierung des kaudal gelegenen Okzipitallappens der des rostral gelegenen Frontallappens ebenfalls leicht voran geht (Barkovich et al. 1988, Staudt et al. 2000). Wiggins zeigte 1986, dass die Myelinisierung beim Menschen schon pränatal beginnt, wobei diese beim Menschen erst im 6. Schwangerschaftsmonat nachweisbar ist (Wiggins 1986, Trepel 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass Myelinisierungsprozesse im Marklager des Frontalhirns bis über die zweite Lebensdekade hinaus anhalten, was den funktionellen Aspekt des frontalen Kortex zum Erlernen und Speichern von Arbeitsabläufen widerspiegelt (Klingberg et al. 1999).

Im fetalen Schaf wurde die beginnende Myelinisierung bereits zum Zeitpunkt 0.61 der Gestationsdauer nachgewiesen, also zu einem etwas späteren Zeitpunkt der Gestation als in unserer Studie (Antonow-Schlorke et al. 2008).

Glukokortikoidrezeptoren

In unserer Studie wurde gezeigt, dass zum Zeitpunkt 0.5 der Gestation Glukokortikoidrezeptoren, vor allem in den Zellkernen der Neurone und Gliazellen in der kortikalen Platte, aber auch in der Intermediärzone und der Subventrikulärzone, im fetalen

Primatengehirn vorhanden sind. Dies steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Sanchez et al. am adulten Rhesusaffen (Sanchez et al. 2000). Es wurde bei anderen intrauterinen Hirnentwicklern wie dem fetalen Schaf gezeigt, dass Glukokortikoidrezeptoren ebenfalls zum Zeitpunkt 0.5 der Gestation in den gleichen Hirnregionen, nämlich der kortikalen Platte, aber auch in der Intermediärzone vorkommen (Brodhun et al. 2004a, Brodhun et al. 2003).

Neuronale Zytoskelettproteine

MAP1B wurde in unserer Studie zu einem frühen Zeitpunkt der Gehirnentwicklung, vor allem in der kortikalen Platte, dem Zielgebiet der neuronalen Migration, nachgewiesen.

Das Vorhandensein von MAP2a,b zum Zeitpunkt 0.5 der Gestation wurde ebenso vor allem in der kortikalen Platte nachgewiesen. Im fetalen Primatengehirn wurde die Expression dieser MAP's bereits erfolgreich im letzten Drittel der Schwangerschaft nachgewiesen (Antonow-Schlorke et al. 2003). Bei Ratten kam MAP2a,b während der pränatalen Entwicklung ebenfalls häufiger in der kortikalen Platte, als in der Intermediärzone vor (Fujimori et al. 2002). Eine Ursache für das hauptsächliche Vorkommen von MAP2a,b in der kortikalen Platte könnte sein, dass die dort befindlichen Neuronen schon differenzierter bzw. reifer sind als in der Intermediärzone, was auch von Fujimori et al. 2002 vermutet wurde (Fujimori et al. 2002).

MAP's sind Schlüsselproteine der Gehirnmorphogenese und der Gehirnfunktion (Tucker 1990, Johnson & Jope 1992). Sie sind strukturelle Proteine zum Aufbau und Erhalt der Neuroarchitektur (Johnson & Jope 1992) und erfüllen als neuronale Zytoskelettproteine wichtige Funktionen für die Regulation der neuronalen Morphogenese (Tucker 1990, Johnson & Jope 1992), sowie für die neuronale Integrität, indem sie die Fortsätze der Nervenzellen stabilisieren und den intrazellulären Transport sicherstellen (Bershadsky & Vasiliev 1989). Bereits ab der 9. Schwangerschaftswoche werden MAP1B und MAP2a,b im menschlichen fetalen Gehirn gefunden (Arnold & Trojanowski 1996, Viereck et al. 1988). Dabei wird MAP1B (350kDa) vorzugsweise in frühen Stadien der Embryonalentwicklung exprimiert und findet sich während der Ontogenese hauptsächlich in den Axonen, aber auch in allen anderen neuronalen Zellkompartimenten wider (Tucker 1990). Dies wurde auch in unserer Studie beobachtet. Bei Ratten kommt es nach der Downregulation des juvenilen MAP2c nach der Geburt zu einer Upregulation von MAP2a, welches dann ebenfalls kontinuierlich exprimiert bleibt (Riederer & Matus 1985).

Glukosetransportproteine 1 und 3

In unserer Studie wurde GLUT1, welches in der Blut- Hirn- Schranke gefunden wird (Maher et al. 1993), in der kortikalen Platte, der Intermediärzone und der Subventrikulärzone zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationszeit in geringen Konzentrationen nachgewiesen. Im fetalen Primatengehirn wurde dieses Glukosetransportprotein bereits im letzten Drittel der Gestation nachgewiesen (Antonow-Schlorke et al. 2007). Auch am fetalen Schaf wurde GLUT1 immunhistochemisch mittels Western Blot Analyse erst am Ende der Gestation nachgewiesen (Anderson et al. 2001). Vannucci zeigte 1994 ebenfalls, dass der Gehalt an GLUT1 im unreifen Gehirn bei Ratten niedrig ist (Vannucci 1994). Auch in unserer Studie kam GLUT1 zum Zeitpunkt 0.5 der Gestation nur in geringen Mengen vor. Im menschlichen Fetus, konnte GLUT1 schon in der 10.Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden (Nualart et al. 1999). Dies könnte auf eine essentielle Funktion dieses Proteins für die Gehirnentwicklung hinweisen. Das geringe Vorkommen von GLUT1 in der Intermediärzone spiegelt wahrscheinlich die geringere Vaskularisation der weißen Substanz zu diesem Zeitpunkt der fetalen Gehirnentwicklung wider.

GLUT3, das hauptsächlich in neuronalen Membranen gefunden wird (Maher et al. 1992, 1993, 1994, Bondy et al. 1992, Vannucci & Simpson 2003), kam in unserer Studie hauptsächlich in der kortikalen Platte, jedoch in niedrigen Konzentrationen, vor. Es wird während der Gehirnentwicklung erst spät exprimiert und wurde beim Menschen nicht vor der 21. Schwangerschaftswoche gefunden (Nualart et al. 1999). Bei Ratten berichteten Vannucci et al. 1996 über eine progressive Expression von GLUT3 während der postnatalen Gehirnentwicklung, die mit der neuronalen Reifung assoziiert ist (Vannucci et al. 1996). In unserer Studie zeigte die Immunmarkierung von GLUT3 eine selektive neuronale Färbung gemäß dem Vorkommen des Proteins in den Neuronen (Maher et al. 1992, 1993, 1994). Das geringe Vorkommen von GLUT3 in der Intermediärzone könnte auf eine niedrigere Zahl von Neuronen in der Intermediärzone hinweisen, da auch in dieser Zone die neuronalen Marker NeuN und Doublecortin gering exprimiert waren. In der kortikalen Platte, in der auch die höchste Konzentration reifer Neurone gemessen wurde, war auch die GLUT3 IR am höchsten.

6.3. Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion

6.3.1 Erzielte Unterernährung

Bisher existiert meines Wissens nach keine Studie, die den Einfluss von moderater mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die fetale Gehirnentwicklung beim Primaten zum Zeitpunkt 0.5 der Gestationsdauer untersucht. Die in unserer Studie erzielten Störungen der Gehirnentwicklung sind bei einem moderaten Niveau der Mangelernährung aufgetreten, die zu keiner fetalen Wachstumsretardierung führte, da weder das Gewicht der fetalen Gehirne (Tab. 3), noch das fetale Körpergewicht (Tab. 3) und das Gewicht der Plazenta (McDonald et al. 2006) durch die mütterliche Nahrungsrestriktion beeinflusst wurden.

Es existieren nur wenige Studien zur Auswirkung von intrauteriner Nahrungsrestriktion auf die fetale Gehirnentwicklung beim Primaten, die sich jedoch in Zeitpunkt oder der Form der Nahrungsrestriktion von unserer Studie unterscheiden, obwohl sich zu diesem Zeitpunkt der Gestation die Grundstrukturen des neuronalen Netzwerkes entwickeln (Hendrickx & Peterson 1997). Beispielsweise war das Ausmaß der mütterlichen Nahrungsrestriktion deutlich stärker (Cheek et al. 1976, Kerr et al. 1970) oder es wurde nur eine Proteinmangelernährung vorgenommen (Riopelle et al. 1975). Experimentelle Studien am Primatengehirn zeigen, dass es bei Reifungsprozessen und der Reaktion auf zerebrale Verletzungen starke strukturelle Ähnlichkeiten zum menschlichen Gehirn gibt (Dieni et al. 2004, Hendrickx & Peterson 1997). Außerdem korreliert der zeitliche Verlauf der Stadien der Hirnentwicklung beim Primaten eng mit denen des Menschen und lässt so Rückschlüsse auf den Menschen zu (Hendrickx & Peterson 1997, Tame et al. 1998). Eine Studie zu den Effekten von früher Nahrungsrestriktion bis zum 1. Lebensjahr beim Menschen von Winick und Rosso zeigte 1969, dass es zu einer Abnahme des Gehirngewichtes, sowie der Protein-, RNA- und DNA- Menge gekommen ist (Winick & Rosso 1969). In dieser Studie wurden Feten bzw. Säuglinge verschiedenen Alters untersucht, die aufgrund starker Mangelernährung gestorben waren, somit war der Zeitraum der jeweiligen Mangelernährung unterschiedlich und auch über die Schwere der Mangelernährung konnten keine konkreten Angaben gemacht werden (Winick & Rosso 1969). Dieses Ausmaß der Mangelernährung, die sogar zum Tod der Feten bzw. Säuglinge führte (Winick & Rosso 1969), erklärt die in unserer Studie fehlenden Effekte der mütterlichen Nahrungsrestriktion auf die fetalen Gehirn- und Körpergewichte, da die Nahrungsrestriktion in unserer Studie ein moderates Niveau besaß.

Cheek et al. untersuchten 1976 die Auswirkungen einer Kalorienrestriktion von 50% sowie einer Proteinrestriktion von ca. 30% auf das fetale Gehirnwachstum bei Rhesusaffen (Cheek

et al. 1976). Wie in unserer Studie fanden auch Cheek et al. keine Veränderungen der Körper- und Gehirngewichte (Cheek et al. 1976). Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei den Protein-, DNA-, RNA-, Cholesterin-, Phospholipid-, Wasser- und Elektrolytkonzentrationen beobachtet, lediglich eine erhöhte Zinkkonzentration trat bei den Feten nach mütterlicher Protein- und Kalorienrestriktion auf (Cheek et al. 1976). Leider wurden in dieser Studie der Entwicklungsstand zellulärer und subzellulärer Strukturen der fetalen Gehirne nicht untersucht, wie in unserer Studie erfolgt, so dass keine Angaben zu möglichen Entwicklungsverzögerungen bzw. einer beeinträchtigten fetalen Gehirnentwicklung gemacht werden konnten (Cheek et al. 1976).

Eine Studie von Riopelle et al., in der 45 trächtige Rhesusaffen eine Proteinmangelernährung bis auf 25% des normalen Proteingehaltes erhielten, zeigte eine Erhöhung fetaler Todesraten, was auf eine starke Beeinträchtigung der fetalen Entwicklung durch den Proteinmangel hindeutet (Riopelle et al. 1975). Die lebenden Neugeborenen zeigten keine Unterschiede in der totalen Proteinkonzentration und dem Albumin/ Globulin- Verhältnis im Blut (Riopelle et al. 1975). In dieser Studie wurden ebenfalls keine histologischen Untersuchungen vorgenommen, sodass keine Angaben zur Beeinträchtigung der Entwicklung des ZNS gemacht werden konnten (Riopelle et al. 1975). Folgestudien zeigten jedoch, dass die mangelernährten Jungtiere nach der Geburt die gleichen Futtermengen aufnahmen wie unbehandelte Jungtiere, die Futtervorlieben unbeeinträchtigt blieben, sich keine Unterschiede in Wahrnehmungs- und Lerntests ergaben und das Wachstum nach der Geburt unbeeinträchtigt blieb (Hillman et al. 1974, Hillman & Riopelle 1977, Hillman et al. 1978, Riopelle & Favret 1977).

Kerr et al. führten 1970 eine Studie an Rhesusaffen im ersten Lebensjahr durch, welche die Effekte einer starken globalen Mangelernährung auf bis zu 25% oder einer Proteinmangelernährung auf bis zu 25%, jeweils durch Verdünnung der Normalnahrung, auf das Wachstum untersuchte (Kerr et al. 1970). Die zerebrale Entwicklung wurde auch in dieser Studie nicht histologisch untersucht (Kerr et al. 1970). Es zeigte sich, dass mangelernährte Rhesusaffen die Futteraufnahme der stark verdünnten Nahrung deutlich erhöhten und das Wachstum blieb hinter der Kontrollgruppe zurück (Kerr et al. 1970). Nach Fütterung der Normaldiät kam es zu einem Aufholwachstum, auch die aufgenommene Futtermenge normalisierte sich (Kerr et al. 1970). Die starke Proteinmangelernährung führte zu keinen Veränderungen der Futteraufnahme, jedoch war auch hier das Wachstum reduziert, welches bis zum 2. Lebensjahr trotz Fütterung der Normalnahrung nicht vollständig aufgeholt wurde (Kerr et al. 1970).

In Studien zur Störungen der Gehirnentwicklung bei Ratten traten erst bei einer sehr starken oder lang anhaltenden globalen Mangelernährung (Lesage et al. 2001, Fuller et al. 1984, Wiggins et al. 1984, Fuller & Wiggins 1984, Royland et al. 1992) bzw. starken Proteinrestriktion (Gressens et al. 1997, Lister et al. 2005, Resnick et al. 1979, Barreto-Medeiros et al. 2004) Effekte auf, die auch zum Gewichtsverlust der Ratten führte (Gressens et al. 1997, Lesage et al. 2001, Fuller et al. 1984, Wiggins et al. 1984, Fuller & Wiggins 1984, Resnick et al. 1979, Barreto-Medeiros et al. 2004, Royland et al. 1992). Allerdings ist die Vergleichbarkeit dieser Daten aufgrund der unterschiedlichen Modelle der Mangelernährung, sowie die Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen aufgrund der unterschiedlichen pränatalen Gehirnentwicklung von Ratte und Mensch schwierig, wie bereits in Kapitel 6.1.1 erläutert wurde. Deshalb ist unsere Studie von besonderer Bedeutung, da sie zum einen an Primaten durchgeführt wurde und somit besser auf den Menschen übertragbar ist als Studien an Ratten und zum anderen eine moderate Nahrungsrestriktion von 30% gewählt wurde, welche sich in entwickelten Ländern als eine Konsequenz von niedrigem Einkommen oder mütterlichen Ernährungsgewohnheiten findet (Bradley & Corwyn 2002, WHO 2002) und auch in Entwicklungsländern von Bedeutung ist (UNICEF 2005). Dies zeigt die bedeutende Rolle von mütterlicher Ernährung für die fetale Gehirnentwicklung.

6.3.2 Effekte auf die Morphologie des Gehirns

Mütterliche Nahrungsrestriktion führte zu einer Reduktion der Ausdehnung der Subventrikulärzone, während weitere Hirnregionen, wie die Intermediärzone und die kortikale Platte in ihrer Morphologie nicht verändert erschienen. Auch die Proportionen der gesamten Hemisphäre zur kortikalen Platte blieben unbeeinträchtigt. Die unbeeinträchtigte Morphologie der kortikalen Platte und der Intermediärzone könnte am moderaten Niveau der in unserer Studie verwendeten Nahrungsrestriktion liegen, da z.B. eine Proteinrestriktion von 75% bei Ratten während der frühen Gestation, zu einer Reduktion der Ausdehnung der kortikalen Platte führte (Gressens et al. 1997). Die Bedeutung einer Reduktion der Subventrikulärzone und deren mögliche Ursachen werden im nächsten Kapitel diskutiert.

6.3.3 Effekte auf die Proliferation und Apoptose

Mütterliche Nahrungsrestriktion führte in der Subventrikulärzone zu einer Zunahme der Zahl von proliferierenden Zellen pro mm² und erhöhte die Zahl apoptotischer Zellen in der Subventrikulärzone. Aufgrund der höheren Zelldichte bei verschmälelter Subventrikulärzone war jedoch die Gesamtzahl von proliferierenden Zellen in der Subventrikulärzone in beiden Gruppen gleich. Der selektive Einfluss von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf den Zelltod in der Subventrikulärzone weist darauf hin, dass eher der frühe Prozess des proliferativen Zelltodes, als die Migration durch die Intermediärzone und der zielbezogene Zelltod in der kortikalen Platte, durch mütterliche Nahrungsrestriktion beeinflusst wurde. Der Anstieg der Apoptose relativ zur Zellproliferation in der Subventrikulärzone könnte eine Störung des komplizierten Ablaufs der Proliferation bedeuten, da der programmierte Zelltod in den Proliferationszonen, wie der Subventrikulärzone, zur Elimination von defekten Zellen führt (Oppenheim 1991). Dafür spricht auch, dass die zielorientierte Apoptose in der kortikalen Platte durch mütterliche Nahrungsrestriktion nicht beeinflusst wurde, was möglicherweise erst später während der Gestation stattfindet (Brodhun et al. 2004a). Der Anstieg des Verhältnisses von programmiertem Zelltod zu Zellproliferation in der Subventrikulärzone, welches den proliferativen Zelltod darstellt, wurde auch beim fetalen Schaf nach Gabe von Glukokortikoiden gezeigt (Brodhun et al. 2004b). In Übereinstimmung mit der sequenziellen Bildung von Vorläuferzellen für neuronale und gliale Gewebe (Temple 2001) wird angenommen, dass der Höhepunkt des proliferativen Zelltodes bei Gliazellen zur Hälfte der Schwangerschaft beim Menschen erst beginnt (Rakic & Zecevic 2000), also zum Untersuchungszeitpunkt unserer Studie. Neuronale Vorläufer sind die Hauptzellpopulation, die durch den programmierten Zelltod im ersten Trimester der menschlichen Schwangerschaft beeinträchtigt werden (Rakic & Zecevic 2000). Es wurde in unserer Studie nicht zwischen den apoptotischen und proliferierenden Zellen neuronaler oder glialer Abstammung unterschieden. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass beim Menschen zu diesem Zeitpunkt der Gestation hauptsächlich Neurone von der Apoptose betroffen sind (Rakic & Zecevic 2000). Dass die Abnahme von unreifen Astrozyten durch mütterliche Nahrungsrestriktion in der Subventrikulärzone nur durch Apoptose bedingt ist, scheint unwahrscheinlich, da z. B. die Proliferation der Gliazellen beim fetalen Schaf ihren Höhepunkt erst im letzten Drittel der Gestation, zum Höhepunkt der Myelinisierung, erreicht wird (Brodhun et al. 2004a) und sich auch beim Menschen erst zur Hälfte der Gestation Gliazellen beginnen dem proliferativen Zelltod zu unterziehen (Rakic & Zecevic 2000).

Auch die Myelinisierung hat zum Zeitpunkt unserer Studie erst begonnen, und zwar in der inneren Schicht der kortikalen Platte, was ebenfalls ein Hinweis darauf ist, dass die Proliferation der Oligodendrozyten noch nicht ihren Höhepunkt erreicht hat.

Ursache für die Störung der Proliferation ist wahrscheinlich ein Mangel an Wachstumshormonen wie IGF-I. Tatsächlich kam es in unserer Studie zu einer verminderten Expression von IGF-I, dies wird im Kapitel 6.4.1 diskutiert.

Die Dichte proliferierender Zellen erhöhte sich in der Subventrikulärzone, da die Subventrikulärzone nach mütterlicher Nahrungsrestriktion verschmälert war. Als ein Ergebnis der höheren Zelldichte in der Subventrikulärzone von Feten nach mütterlicher Nahrungsrestriktion blieb die Gesamtzahl von proliferierenden Zellen in der Subventrikulärzone beider Gruppen jedoch unverändert (Tab. 5). Dies weist darauf hin, dass die schmalere Subventrikulärzone mit dichter gepackten proliferierenden Zellen durch eine Veränderung bzw. Reduktion der extrazellulären Matrix verursacht worden sein müsste. Gleichmaßen berichteten Rees et al. (1988) bei wachstumsretardierten fetalen Schafen am Ende der Gestation über eine höhere Zelldichte in einem schmaleren zerebralen Neokortex, ohne proportionale Veränderungen der Morphologie des Gehirns, welches ebenfalls auf eine Reduktion der extrazellulären Matrix hinweisen könnte (Rees et al. 1988). Es gibt viele verschiedene extrazelluläre Matrixproteine, jedoch ist Tenascin C das wichtigste während der fetalen Entwicklung exprimierte Matrixprotein (Jones & Jones 2000). Tenascin C, welches stark in der Subventrikulärzone exprimiert wird, kontrolliert die Stammzellentwicklung (Jones & Jones 2000) und verstärkt die Wirkung von Wachstumsfaktoren während der Entwicklung von myelinbildenden Oligodendrozyten (Garcion et al. 2001). Somit könnte ein Mangel an Tenascin C zu der verminderten Breite der Subventrikulärzone und auch zu der verminderten Anzahl von Gliazellen in dieser Studie geführt haben. Umgekehrt führt auch ein IGF-I Mangel zu einem Mangel an Tenascin C (Wilson et al. 1999). Diese Beeinflussung der Expression von Tenascin C durch IGF wurde bereits bei Ovarialkarzinomen, in denen Tenascin C hochexprimiert vorkommt, gezeigt (Wilson et al. 1999). Ein Mangel an extrazellulären Matrixmolekülen wie Tenascin C hat nachteilige Effekte auf die Entwicklung und die Funktionen des ZNS und führt zu bleibenden Hirnfunktionsstörungen. Beispielsweise kam es zu Hyperaktivität und verminderten Koordinations- und Lernleistungen bei Mäusen mit Tenascin C- Mangel (Jones & Jones 2000). Um mögliche Hirnfunktionsstörungen weiter zu beschreiben ist es deshalb wichtig, die Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf die fetale Hirnentwicklung am Ende der Schwangerschaft zu untersuchen.

Die Untersuchung der Mechanismen, die zu den vorliegenden Effekten führen und die nicht Teil meiner Arbeit waren, zeigten, dass IGF-I, als wichtigster Wachstumsfaktor während der fetalen Entwicklung, durch mütterliche Nahrungsrestriktion vermindert wird (siehe Kapitel 6.4.1, Schwab et al. 2005). Dies könnte bedeuten, dass Nahrungsrestriktion, die zu einer Reduktion von IGF-I führte, zu einer Reduktion der Expression von Tenascin C führt und es somit zu einer Reduktion der extrazellulären Matrix, gezeigt durch die schmalere Subventrikulärzone, gekommen ist.

6.3.4 Effekte auf die neuronale und gliale Reifung

Mütterliche Nahrungsrestriktion führte zu einer Reduktion der glialen S-100 β IR, also von unreifen Astrozyten in der Subventrikulärzone, aber zu keiner Beeinflussung radialer Gliazellen und reifer Astrozyten, sowie reifer und unreifer Neurone.

Die Abnahme der S-100 β IR bedeutet am ehesten eine Abnahme unreifer Astrozyten, da wir streng darauf geachtet haben S-100 β nur intrazellulär zu messen. Um dies sicher zu belegen, müsste die Zellzahl der unreifen Astrozyten bestimmt werden, die jedoch in unserer Studie nicht untersucht worden ist.

Während der zerebralen Entwicklung stellt S-100 β ein wichtiges neurotrophes Protein dar, welches von Astrozyten produziert wird und gleichzeitig die Proliferation von Astrozyten erhöht und damit das neuronale Überleben steigert, das Neuritenwachstum stimuliert und synaptische Funktionen moduliert (Van Eldik & Wainwright 2003). Bei reduzierter S-100 β Expression in Mäusen wurde gezeigt, dass es zu einer Störung radialer Gliazellen, der neuronalen Migration und auch zu einer Reduktion S-100 β positiver Zellen, als Ausdruck einer verminderten Proliferation, kommt (Ueda et al. 1997), was ebenfalls auf die Bedeutung von S-100 β als neurotrophes Protein hinweist.

Obwohl das extrazelluläre Vorkommen von S-100 β in unserer Studie nicht gemessen wurde, ist die intrazelluläre S-100 β Abnahme ein Zeichen für eine potentielle Verminderung des neurotrophen Faktors. Unter mütterlicher Nahrungsrestriktion kam es zu keiner Änderung der Zahl unreifer und reifer Neurone und damit zu keiner offensichtlichen Störung der neuronalen Reifung. Allerdings könnte die Störung der Bildung des neuronalen Netzwerkes möglicherweise durch einen S-100 β - Mangel mitbedingt sein. Insgesamt sind dies jedoch nur Vermutungen, da die S-100 β IR nicht im Extrazellulärraum gemessen wurde.

6.3.5 Effekte auf die Migration

In unserer Studie haben wir gezeigt, dass die Migration neuronaler Zellen zum Untersuchungszeitpunkt durch mütterliche Nahrungsrestriktion unbeeinträchtigt blieb. Die Migration von Gliazellen und Neuronen findet beim menschlichen Feten hauptsächlich in der 12. bis 24. Schwangerschaftswoche statt (Sidman & Rakic 1973), das heißt zu einem Stadium der fetalen Gehirnentwicklung an dem in unserer Studie die neuronale Migration ebenfalls gezeigt wurde. Dies wird dadurch deutlich, dass zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits reife Neurone im Zielgebiet der Migration, der kortikalen Platte, gefunden wurden. Die Migration der Zellen in die kortikale Platte erfolgt von innen nach außen (Caviness et al. 1995), welches auch in dieser Arbeit belegt wurde, da reife Neuronen vor allem in der inneren Schicht der kortikalen Platte zu finden waren. Für die relative Reife dieser Region spricht auch die dortige beginnende Myelinisierung (siehe Kapitel 6.3.7). Die neuronalen Vorläuferzellen, die in den Proliferationszonen wie der Subventrikulärzone entstanden sind (Caviness 1973, Caviness et al. 1995) und auch in dieser Arbeit nachgewiesen wurden, wandern anhand strahlenförmig ausgerichteter Fasern der radialen Gliazellen in ihre Zielgebiete, z. B. den zerebralen Kortex (Sidman & Rakic 1973). Das Vorkommen unreifer Neurone in der Intermediärzone und der kortikalen Platte zeigt, dass unreife Neurone erst bis in ihr Zielgebiet migrieren, um sich dort zu differenzieren. Auch die strahlenförmig ausgerichteten Fasern der radialen Gliazellen, die als Leitstruktur der Migration dienen (Rakic 2003), wurden in dieser Arbeit nachgewiesen (Abb. 13).

Eine mögliche Ursache für die durch die mütterliche Nahrungsrestriktion unbeeinträchtigte Migration könnten die unbeeinflussten radialen Gliazellen, deren lange Fasern eine wichtige Leitstruktur für die Migration darstellen, sein (Rakic 2003, Rakic & Zecevic 2000).

6.3.6 Effekte auf die Arborisierung

Mütterliche Nahrungsrestriktion führte zu einer Reduktion der Arborisierung in der inneren kortikalen Platte. Eine mögliche Ursache, weshalb besonders die innere kortikale Platte betroffen ist, könnte die Migration der Zellen in der kortikalen Platte von innen nach außen sein (Caviness 1973). Dies könnte bedeuten, dass es zu einer Störung der in der frühen Gestation ausgewanderten Neuronen gekommen ist, die sich jetzt in der inneren Schicht der kortikalen Platte befinden und das neuronale Netzwerk beginnen zu bilden. Eine weitere

Ursache für die verminderte Arborisierung könnte auch die Reduktion von S-100 β sein, da es neben seiner Aufgabe als ein Markerprotein für unreife Astrozyten, ein wichtiges neurotrophes und neuroprotektives Protein darstellt, dass von Astrozyten gebildet wird (Haglid et al. 1997). Bei Mäusen mit einer verminderten Expression von S-100 β wurde gezeigt, dass es zu einer Reduktion von serotonergen Fasern kommt und zu einer Störung der radialen Gliazellen, die besonders wichtig für die Migration neuronaler Vorläuferzellen sind und damit indirekt auch für das Neuritenwachstum bedeutsam sind (Ueda et al. 1994 und 1997, Rakic 2003). Die Reduktion von S-100 β könnte somit zu einer verminderten Verzweigung des neuronalen Netzwerkes bei den Feten nach mütterlicher Nahrungsrestriktion geführt haben.

Ob die verminderte Arborisierung jedoch dauerhaft bestehen bleibt, oder ein Zeichen einer verzögerten Entwicklung ist, muss in Folgestudien, die die Effekte einer mütterlichen Nahrungsrestriktion auf spätere Hirnentwicklungsstadien untersuchen, gezeigt werden.

6.3.7 Effekte auf die Myelinisierung

Zum Untersuchungszeitpunkt unserer Studie war die Myelinisierung in der inneren kortikalen Platte am weitesten vorangeschritten und es wurde eine Abnahme der kortikalen Myelinisierung nach mütterlicher Nahrungsrestriktion beobachtet. Zwar wurden Oligodendrozyten, die für die Myelinisierung verantwortlich sind, in unserer Studie nicht speziell untersucht, jedoch könnte neben der Reduktion unreifer Astrozyten auch die Ausbildung von Oligodendrozyten durch die Nahrungsrestriktion betroffen sein. Die Myelinisierung ist vor allem für eine Mangelernährung während der Proliferation und Reifung von Vorläuferzellen der Oligodendrozyten vulnerabel (Wiggins 1986). Robain und Ponsot zeigten 1978, dass es durch eine starke postnatale Mangelernährung bei Ratten zu Defiziten der Oligodendrozytenreifung kommt (Robain & Ponsot 1978). Allerdings zeigten Sikes et al 1981, dass es bei mangelernährten Ratten zu keinen Veränderungen der Zellzahl von Oligodendrozyten kam und damit nicht die Proliferation der Oligodendrozyten sondern erst deren Reifung beeinträchtigt wurde (Sikes et al. 1981).

Es wurde bei Ratten gezeigt, dass selbst eine milde postnatale Mangelernährung bereits zu einer Verminderung der Myelinkonzentration führte und vermutet, dass eine verminderte Myelinkonzentration eine verminderte Arborisierung widerspiegelt (Royland et al. 1992, Wiggins 1982). Auch in unserer Studie kam es zu einer verminderten Arborisierung nach mütterlicher Nahrungsrestriktion und damit zu einer verminderten Anzahl an Zellfortsätzen,

was eine Hypomyelinisierung vortäuschen kann. Eine Hypomyelinisierung hat potentielle negative Langzeiteffekte, da bei Ratten gezeigt wurde, dass ein Myelinmangel, verursacht durch Unterernährung, nicht durch Wiederherstellung der Nahrungszufuhr kompensiert werden kann (Fuller & Wiggins 1984). Beim Menschen führt eine Hypomyelinisierung zu lang anhaltenden Effekten auf kognitive Funktionen und zu Verhaltensauffälligkeiten im späteren Leben (Wiggins 1982).

Die Myelinisierung durch Oligodendrozyten beginnt beim Menschen erst unter dem Reiz neuronaler Impulse im 6. Schwangerschaftsmonat (Trepel 1999). Auch beim Menschen wurden eine Reduktion der Proteinkonzentration in der weißen Substanz, eine verminderte Nervenleitungsgeschwindigkeit und eine verminderte Zellproliferation, sowie verminderte Gehirngewichte und eine Reduktion der Myelinisierung, sowie von Synapsen und Neurotransmittern, durch Mangelernährung nachgewiesen (Udani 1992, Wiggins 1982, Winick 1976).

Dies zeigt, dass die Auswirkungen einer Nahrungsrestriktion auf die Myelinisierung in zukünftigen Studien am Ende der Gestation weiter untersucht werden müssen.

6.3.8 Effekte auf die Glukokortikoidrezeptoren

Mütterliche Nahrungsrestriktion führte zu einem Anstieg der Glukokortikoidrezeptoren in der Intermediärzone. Endogene Glukokortikoide, wie Kortisol beim Primaten oder Kortikosteron bei Nagern, sind essentiell für die Gehirnentwicklung (Rosenfeld et al. 1993). Erhöhte Konzentrationen an Glukokortikoiden werden bei Stress ausgeschüttet (wie bei einer fetalen Mangelernährung) und führen zu einer Förderung des Zelltodes, wie in unserer Studie gezeigt (Hassan et al. 1996, Rosenfeld et al. 1993). Glukokortikoide werden z.B. zur Induktion der Lungenreifung eingesetzt, bewirken jedoch eine veränderte zerebrale Hirnentwicklung und auch eine Wachstumsverzögerung, die jedoch in unserer Studie nicht nachgewiesen wurde (French et al. 1999, Modi et al. 2001).

Eine Differenzierung zwischen neuronalen und glialen Zellen wurde bei der Untersuchung der Glukokortikoidrezeptoren nicht vorgenommen, dies muss in Folgestudien näher untersucht werden. Whorwood et al. zeigten 2001, dass mütterliche Nahrungsrestriktion auch beim fetalen Schaf zu einer Zunahme der Glukokortikoidrezeptoren in Organen, wie Leber, Niere, Nebenniere und Lunge führte (Whorwood et al. 2001). Als wesentliche Ursache für die Störung der Gehirnentwicklung nach mütterlicher Nahrungsrestriktion werden die Effekte von

chronischem pränatalem Stress und damit auch die Wirkungen von Glukokortikoiden im Kapitel 6.4.2 diskutiert.

6.3.9 Effekte auf die neuronalen Zytoskelettproteine

Mütterliche Nahrungsrestriktion führte zu keinen Veränderungen in der IR von MAP1B und MAP2a,b.

Dies könnte bedeuten, dass die unbeeinträchtigten neuronalen Zytoskelettproteine auch dazu beigetragen haben, dass die neuronale Entwicklung durch mütterliche Nahrungsrestriktion nicht beeinflusst wurde. Zytoskelettveränderungen während der Gehirnentwicklung führten zu der Vermutung, dass die juvenilen Formen MAP1B und MAP2 eine Bedeutung für die Plastizität und Flexibilität der neuronalen Fortsätze während der neuronalen Aussprossung haben (Ferreira et al. 1989, Johnson & Jope 1992, Tucker et al. 1988).

Zusätzlich könnte dies bedeuten, dass MAP1B und MAP2a,b nicht für die Ausbildung und damit die Zahl der neuronalen Fortsätze essentiell sind, da es zu einer Reduktion der Arborisierung nach mütterlicher Nahrungsrestriktion kam (siehe Kapitel 6.3.6). Ein weiterer Mechanismus könnte jedoch auch die Abhängigkeit der Arborisierung von anderen Faktoren, wie ein Mangel an Wachstumsfaktoren oder eine Störung der Oligodendrozyten, sein.

6.3.10 Effekte auf die Glukosetransportproteine 1 und 3

In unserer Studie wurde gezeigt, dass mütterliche Nahrungsrestriktion zu keinen Veränderungen der IR von GLUT1 und GLUT3 führte. Auch beim fetalen Schaf und im fetalen Paviangehirn konnte gezeigt werden, dass eine pränatale Therapie mit Glukokortikoiden zu keinerlei Veränderungen der Expression von GLUT1 und GLUT3 führte (Antonow-Schlorke et al. 2006, Antonow-Schlorke et al. 2007). GLUT1 und GLUT3 scheinen also relativ stabile Proteine zu sein und unbeeinflusst von der Nahrungsrestriktion geblieben zu sein. Offensichtlich ist die ungestörte Glukoseaufnahme in das Gehirn auch eine mögliche Ursache für die fehlenden Effekte von mütterlicher Nahrungsrestriktion auf das fetale Gehirnwachstum, da ein Großteil der Energie und damit auch ein Großteil des Glukoseangebotes während der Gestation für die ZNS- Entwicklung genutzt wird (Vannucci & Vannucci 2000).

6.4 Potentielle Ursachen für die Effekte der mütterlichen Nahrungsrestriktion

6.4.1 Wachstumsfaktoren

Die in unserer Studie gezeigten Veränderungen der fetalen Gehirnentwicklung nach mütterlicher Nahrungsrestriktion sind mit einer verminderten Bioverfügbarkeit von zirkulierendem IGF-I verbunden (Schwab et al. 2005). Die Bestimmung dieses Wachstumsfaktors war nicht Teil meiner Arbeit. Neben IGF-I sind noch weitere Wachstumsfaktoren für die neuronale Migration und Reifung von Bedeutung wie Neurotrophin-3 und BDNF (brain-derived neurotrophic factor)(Niblock et al. 2000), welche jedoch in unserer Studie nicht untersucht wurden. Weiterhin kommt als Ursache für die dargestellten Veränderungen eine potentielle Verminderung von S-100 β , als neurotrophes Protein, in Frage, welches in den Kapiteln 6.3.4 und 6.3.6 diskutiert wird.

IGF-I fördert die Zellproliferation, das Neuritenwachstum und die Myelinisierung in frühen Stadien der Gehirnentwicklung (Niblock et al. 2000, D'Ercole et al. 1996, O'Kusky et al. 2000, Ajo et al. 2003, Anlar et al. 1999) und ist somit einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren während der fetalen Entwicklung.

Während einer Mangelernährung kommt es zur Suppression von IGF-I. Bereits bei Ratten und Schafen wurde nach einer Unterernährung eine Reduktion des zirkulierenden und lokal exprimierten IGF-I im sich entwickelnden Gehirn gezeigt (Thiessen et al. 1994, Gluckman & Harding 1997, Chowen et al. 2002, Fowden 2003). Die Bioverfügbarkeit und die biologische Wirkung von IGF-I werden durch eine Familie von 6 hochaffinen IGF Bindungsproteinen reguliert (IGFBP1 bis IGFBP6). IGF-I ist hauptsächlich an das IGFBP3 gebunden (Thiessen et al. 1994, Cohen et al. 1991), welches reichlich im fetalen Kreislauf des Menschen (Giudice et al. 1995) und auch im fetalen Rattengehirn nachgewiesen wurde (Ajo et al. 2003).

Nach mütterlicher Nahrungsrestriktion kam es in unserer Studie zu einem Anstieg von IGFBP3 (Schwab et al. 2005). Dies könnte zu der reduzierten Bioverfügbarkeit von IGF-I beitragen, da das ungebundene freie IGF-I vermindert war und das Gesamt IGF-I eine Tendenz zur Verminderung zeigte (Schwab et al. 2005). Andererseits wurde bei wachstumsretardierten menschlichen Frühgeborenen eine Reduktion von IGFBP3 gezeigt (Giudice et al. 1995). Dieser Unterschied könnten durch eine andere Genese der intrauterinen Wachstumsretardierung und den deutlich ausgeprägteren Effekten auf den Feten und somit der Beeinflussung einer Vielzahl weiterer physiologischer Mechanismen, verglichen mit der moderaten mütterlicher Nahrungsrestriktion, die ohne Effekte auf das fetale Wachstum blieb (zumindest in dem untersuchten Gestationsalter), hervorgerufen worden sein. Die Regulation

der IGF Bindungsproteine ist komplex und hängt vom Stadium der Entwicklung ab (Thiessen et al. 1994, Gluckman & Harding 1997, Fowden 2003).

Die gliale Proliferation und daher auch die Myelinisierung könnten durch das IGF-I Defizit nach mütterlicher Nahrungsrestriktion verzögert worden sein (Ye et al. 2000). Auch der Anstieg des programmierten Zelltodes in der Subventrikulärzone könnte durch das IGF-I Defizit hervorgerufen worden sein, da IGF-I während früher Stadien der Entwicklung den proliferativen Zelltod reduziert und somit ein Mangel von IGF-I zu einem Anstieg des programmierten Zelltodes führen kann (O'Kusky et al. 2000). Während der Hirnentwicklung erhöht IGF-I die Verzweigungen und die Ausbreitung der Dendriten von Pyramidenzellen (Niblock et al. 2000, O'Kusky et al. 2000). Die reduzierte Bioverfügbarkeit von IGF-I nach mütterlicher Nahrungsrestriktion könnte somit also auch zu der verminderten neuronalen Arborisierung und Myelinisierung geführt haben, die sich in einer verzögerten Reifung des neuronalen Netzwerkes widerspiegelt.

6.4.2 Chronischer pränataler Stress

Mütterliche Nahrungsrestriktion führte in der Intermediärzone zu einem Anstieg der Zahl der Glukokortikoidrezeptoren.

Fetale Mangelernährung kann mit chronischem pränatalem Stress einhergehen und zu erhöhten fetalen Kortisolspiegeln führen. Bei den hier untersuchten Tieren wurden durch die besonderen Haltungs- und Fütterungsbedingungen mögliche andere Ursachen für mütterlichen Stress vermieden, das heißt, der einzige Stressor war die durchgeführte Nahrungsrestriktion. Leider wurden die mütterlichen und fetalen Kortisolspiegel in unserer Studie nicht bestimmt.

Die fetale Hypothalamus- Hypophysen- Nebennierenrinden- Achse (HHN- Achse) nimmt erst kurz vor der Geburt ihre sekretorischen Funktionen auf, das heißt obwohl der Fetus Stress aufgrund der Nahrungsrestriktion ausgesetzt ist, muss das Kortisol von der Mutter stammen (Takahashi et al. 1998). Tatsächlich wird der fetale Kortisolplasmaspiegel an Stresshormonen durch die 11 β - Hydroxysteroid- Dehydrogenase 2 reguliert, die normalerweise mehr als 95% des mütterlichen Kortisols am Übertritt in den fetalen Kreislauf durch Inaktivierung hindert (Benediktsson et al. 1997). Untersuchungen bei Ratten zeigen, dass Nahrungsrestriktion während der Schwangerschaft die Aktivität der 11 β - Hydroxysteroid- Dehydrogenase 2 reduziert (Langley-Evans et al. 1996). Dies führt dazu, dass Glukokortikoide nicht mehr

ausreichend in der Plazenta inaktiviert werden und damit ihr Übertritt in den fetalen Kreislauf erhöht wird und so auch der fetale Organismus erhöhten Kortisolspiegeln ausgesetzt ist (Langley-Evans et al. 1996).

Glukokortikoide wirken über intrazelluläre Rezeptoren als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren (Welberg & Seckl 2001). Bei Primaten ist das wichtigste Glukokortikoid das Kortisol, welches an 2 Rezeptortypen bindet (Welberg & Seckl 2001). Einerseits mit hoher Affinität an Mineralkortikoidrezeptoren und nur in hohen supraphysiologischen Dosen mit niedriger Affinität an Glukokortikoidrezeptoren (Welberg & Seckl 2001), die in unserer Studie untersucht wurden und eine Zunahme in der Intermediärzone nach mütterlicher Nahrungsrestriktion zeigten. Dies hat möglicherweise eine erhebliche Bedeutung, denn im adulten Rattengehirn wurde gezeigt, dass der programmierte Zelltod durch Glukokortikoide vermittelt ist (Vanderbilt et al. 1987, Distelhorst 1997). Eine selektive Besetzung von Glukokortikoidrezeptoren vom Typ II bewirkt einen Anstieg der Apoptose (Hassan et al. 1996). Auch im sich entwickelnden Gehirn der Ratte regulieren Glukokortikoide die Gehirnentwicklung, zum einen durch Induktion der Neurogenese, und zum anderen durch Hemmung der Proliferation (Gould et al. 1991*a, b*). Bei pränatal nur wenige Tage zu Beginn der Gestation proteinmangelernährten Ratten wurde ebenfalls gezeigt, dass mütterlicher Stress, ausgelöst durch die Proteinmangelernährung von 50%, zu einer Hemmung der Zellproliferation bei den Feten führte (Kwong et al. 2000). Weiterhin konnte bei Ratten gezeigt werden, dass eine einmalige pränatale Glukokortikoidbehandlung zu einem Anstieg der Apoptoserate führte (Ahlbom et al. 2000). Eine antenatale Glukokortikoidbehandlung förderte die Zellproliferation und erhöhte den programmierten Zelltod auch im fetalen Schafgehirn zum Zeitpunkt 0.75 der Gestation, also zu einem etwas späteren Zeitpunkt als in unserer Studie (Brodhun et al. 2004b).

Die durch den Stress induzierte Erhöhung der fetalen Glukokortikoidspiegel beeinflusst die Gehirnentwicklung, das Verhalten und die Kognition im späteren Leben. Pränatal gestresste Ratten hatten ein erniedrigtes Geburtsgewicht und zeigten im Erwachsenenalter eine erhöhte basale Aktivität der HHN- Achse, sowie eine gestörte Regulation dieser Achse (Weinstock 1997, Matthews 2002, Huizink et al. 2003). Die mit der Störung der HHN- Achse verbundene verstärkte Ausschüttung von endogenen Steroiden, wie Kortikosteron bei der Ratte, führt zu einer verlängerten Reaktion auf Stress, sowie einer Abnahme von Glukokortikoid- und Mineralkortikoidrezeptoren im Hippokampus, die in die negative Rückkopplung der HHN- Achse involviert sind (Weinstock 1997, Matthews 2002, Huizink et al. 2003). Der Anstieg der Glukokortikoidrezeptoren in unserer Studie steht im Kontrast zu diesen Studien. Andererseits

existieren jedoch auch Studien z.B. am postnatalen Schwein, die zeigen, dass pränataler Stress zu einer Erhöhung der Anzahl von Glukokortikoidrezeptoren im Hippokampus und zu einer Reduktion von Glukokortikoidrezeptoren im Hypothalamus führte (Kanitz et al. 2003). Nyirenda et al. zeigten 1998, dass pränataler Stress zu einem Anstieg der Glukokortikoidrezeptor mRNA bei Ratten in der Leber führte und vermuteten dadurch eine Prädisposition für eine Glukoseintoleranz im Erwachsenenalter (Nyirenda et al. 1998). Ein weiteres Kriterium für die Entwicklung des chronischen pränatalen Stresses und seiner Effekte könnte das Zeitfenster, in der die mütterliche Nahrungsrestriktion in unserer Studie stattfand, sein. Es könnte zum einen zu früh während der fetalen Entwicklung und zum anderen auch noch nicht lang genug gewesen sein, um die vollständigen Effekte einer Glukokortikoidbelastung hervorzurufen.

Die Verschmälerung der Subventrikulärzone nach mütterlicher Nahrungsrestriktion könnte ebenfalls durch den chronischen Stress verursacht worden sein. Beim erwachsenen Primaten verursachte chronischer Stress eine Abnahme des Volumens der Granularzellschicht im Gehirn und war mit einer Abnahme von proliferierenden Zellen in dieser Region verbunden (Gould et al. 1998).

Parallel dazu erhöhte sich die Zelldichte in der schmalen Subventrikulärzone nach mütterlicher Nahrungsrestriktion. So kam es zu einer Zunahme von proliferierenden Zellen pro mm², jedoch war die Gesamtzahl von proliferierenden Zellen in der Subventrikulärzone in beiden Gruppen gleich. Eine mögliche Ursache für die unbeeinflusste Zellproliferation in unserer Studie könnte der relativ geringe Kortisolanstieg im Vergleich zu den Studien, in denen Dexamethason (Ahlbom et al. 2000) und Betamethason (Brodhun et al. 2004b) direkt appliziert wurde, sein. Zudem wirkt Kortisol in physiologischen Dosen nicht über die apoptoseinduzierenden Glukokortikoidrezeptoren, sondern über Mineralkortikoidrezeptoren (Takahashi et al. 1998). Deshalb ist die in einigen Studien benutzte pharmakologische Stressinduktion durch Dexamethason, welches selektiv an Glukokortikoidrezeptoren bindet, eine höhere biologische Wirksamkeit als Kortisol besitzt und dadurch Apoptose bewirkt (Yang et al. 1990, Hassan et al. 1996), wahrscheinlich die Ursache für die neben der Apoptose gestörte Zellproliferation (Gould & Cameron 1996, Tauber et al. 2006). In unserer Studie wirken wahrscheinlich die besetzten Mineralkortikoidrezeptoren protektiv auf die Zellproliferation, jedoch nicht auf die Apoptose. Dieser protektive Mechanismus könnte auch die Ursache für die unbeeinflusste Immunoreaktivität von MAP1B und MAP2a,b sein, da am fetalen Paviangehirn bereits gezeigt wurde, dass eine direkte Applikation von Betamethason

zu einer Abnahme der Immunoreaktivität von MAP1B und MAP2a,b,c geführt hat (Antonow-Schlorke et al. 2002).

Es gibt auch beim Menschen Hinweise darauf, dass erhöhte Spiegel von Glukokortikoiden während der Schwangerschaft negative Effekte auf die funktionelle Hirnentwicklung haben. Mütterlicher Stress führte während der Schwangerschaft zu einem erniedrigten Geburtsgewicht (Wüst et al. 2005) und auch zu Frühgeburtlichkeit (Wadhwa et al. 2001). Weiterhin wurden Verhaltensauffälligkeiten und eine verzögerte kognitive und motorische Entwicklung nach mütterlichem Stress während der Schwangerschaft beobachtet (Wüst et al. 2005, Huizink et al. 2003).

Interessanterweise wird IGF-I auch durch Stress beeinflusst. Es wurde in tierexperimentellen Studien bei Ratten gezeigt, dass eine pränatale Belastung mit Glukokortikoiden die Regulation vieler Komponenten des IGF- Systems beeinflusst (Seckl 1998). Glukokortikoide regulieren einerseits die IGF- Gene und andererseits auch ihre Rezeptoren im Fetus und in der Plazenta (Price et al. 1992, Li et al. 1993). Dies zeigt, dass beide Mechanismen möglicherweise eng miteinander interagieren und nicht getrennt betrachtet werden können. Ein Zusammenwirken dieser beiden Komponenten stellt möglicherweise die Ursache der in unserer Studie gezeigten Veränderungen der fetalen Gehirnentwicklung nach mütterlicher Nahrungsrestriktion dar.

7. Schlussfolgerung

Moderate mütterliche Nahrungsrestriktion, die keine fetale Wachstumsretardierung verursachte, induziert während der ersten Hälfte der Gestation Störungen der Gehirnentwicklung bei nicht-humanen Primaten. Besonders konnte die beeinträchtigte Gehirnentwicklung durch einen Anstieg des proliferativen Zelltodes in der Subventrikulärzone, eine Abnahme der normalen Ausdehnung der Subventrikulärzone und eine Abnahme unreifer Astrozyten gezeigt werden. Weiterhin führte mütterliche Nahrungsrestriktion zu einer Verzögerung der Reifung des neuronalen Netzwerkes, die sich in einer verminderten neuronalen Verzweigung und einer Hypomyelinisierung zeigte.

Die Mechanismen für diese Veränderungen sind vielfältig, jedoch scheinen eine verminderte Bioverfügbarkeit von zirkulierendem IGF-I und die Auswirkungen von chronischem pränatalem Stress bedeutend an diesen Veränderungen beteiligt zu sein. Obwohl die Zeitspanne des Gehirnwachstums beim Menschen zwischen dem zweiten Trimester und dem zweiten Lebensjahr als das kritischste Zeitfenster für Schädigungen durch Umwelteinflüsse angesehen wird (Pollitt 2000), wurden in unserer Studie strukturelle Veränderungen der Gehirnentwicklung durch moderate mütterliche Nahrungsrestriktion bereits in der ersten Hälfte der Gestation aufgezeigt. Da diese Ergebnisse aus ethischen Gründen nicht von menschlichem fetalem Gewebe erhalten werden konnten, untermauern sie die Wichtigkeit von weiteren Untersuchungen der normalen und beeinflussten fetalen Gehirnentwicklung beim Primaten. Um langfristige Effekte auf die Gehirnentwicklung bei Feten nach mütterlicher Nahrungsrestriktion und die Mechanismen, die die zerebrale Reifung verändern, aufzuklären, sind Folgestudien nötig. Das heißt, dass auch das Potenzial dieser Feten, die Veränderungen entweder prä- oder postnatal aufzuholen und die funktionellen Folgen der mütterlichen Nahrungsrestriktion auf die Entwicklung dieser Feten, muss in Folgestudien geklärt werden. Die Untersuchung funktioneller Folgen einer mütterlichen Nahrungsrestriktion kann in retrospektiven Studien und aufgrund der Länge schwierig durchzuführenden prospektiven Studien beim Menschen nur schwer erfolgen. Aufgrund der Schwierigkeit prospektive Studien am Menschen durchzuführen, sind deshalb weitere Studien am nicht-humanen Primaten und gegebenenfalls die Aufklärung zugrunde liegender Mechanismen in Nagermodellen notwendig.

Selbst eine moderate pränatale mütterliche Nahrungsrestriktion hat möglicherweise langfristige Folgen für die Hirnfunktion, die bis in das Erwachsenenleben hineinreichen. Dieser Effekt wird als fetale Programmierung bezeichnet und bedeutet, dass es zu

motorischen und kognitiven Entwicklungsstörungen sowie Verhaltensauffälligkeiten kommen kann (McMillen & Robinson 2005, Welberg & Seckl 2001, Schwab 2007).

Die Bedeutung einer fetalen Mangelernährung spielt für den Menschen eine große Rolle, da 35% bis 40% der Kinder weltweit an moderater Mangelernährung, wie in unserer Studie genutzt, leiden (UNICEF 2001). Dabei kommt diese Form der Mangelernährung nicht nur in Entwicklungsländern vor, sondern spielt auch in Industrieländern eine immer größere Rolle (WHO 2002), da gerade eine Mangelernährung zu einer beeinträchtigten kognitiven Entwicklung und persistierenden intellektuellen Störungen und Aufmerksamkeitsdefiziten bis zum Erwachsenenalter führen kann (Olness 2003). Deshalb spielt eine gesunde, ausgewogene Ernährung während der Schwangerschaft, ebenso wie die Aufklärung über gesunde Ernährungs- und Lebensweisen, nicht nur in den entwickelten Ländern, sondern auch in Entwicklungsländern eine wichtige Rolle. Unter Berücksichtigung aller politischer Korrektheit muss deshalb hervorgehoben werden, dass mangelernährte Kinder per se im späteren Leben deutlich benachteiligt sind, da eine starke Mangelernährung zu persistierenden kognitiven Störungen führen kann (Olness 2003). Deshalb war die Vorstellung der Ergebnisse dieser Studie bei verschiedenen Kongressen gerade für Vertreter aus Entwicklungsländern von besonderem Interesse. Derzeit werden die Effekte einer mütterlichen Nahrungsrestriktion beim Primaten am Ende der Gestation untersucht, um zu zeigen, inwieweit es zu persistierenden Effekten auf die Gehirnentwicklung kommt. Allerdings lagen bisher noch keine Ergebnisse vor.

Dieses Modell der mütterlichen Nahrungsrestriktion ist im Vergleich zu Studien an Ratten, aufgrund der besseren Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen, von sehr hoher Relevanz und eignet sich deshalb auch besonders für zukünftige Untersuchungen in diesem wichtigen Forschungsfeld.

8. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. **Ahlbom E**, Gogvadze V, Chen M, Celsi G, Ceccatelli S. 2000. Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(26):14726-14730.
2. **Ajo R**, Cacicedo L, Navarro C, Sanchez-Franco F. 2003. Growth hormone action on proliferation and differentiation of cerebral cortical cells from fetal rat. *Endocrinology*, 144(3):1086-1097.
3. **Almeida SS**, Tonkiss J, Galler JR. 1996a. Prenatal protein malnutrition affects the social interactions of juvenile rats. *Physiol Behav*, 60(1):197-201.
4. **Almeida SS**, Tonkiss J, Galler JR. 1996b. Prenatal protein malnutrition affects exploratory behavior of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav*, 60(2):675-680.
5. **Ambrus JL Sr**, Ambrus JL Jr. 2004. Nutrition and infectious diseases in developing countries and problems of acquired immunodeficiency syndrome. *Exp Biol Med (Maywood)*, 229(6):464-472.
6. **Anderson MS**, Flowers-Ziegler J, Das UG, Hay WW Jr, Devaskar SU. 2001. Glucose transporter protein responses to selective hyperglycemia or hyperinsulinemia in fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281(5):R1545-552.
7. **Anlar B**, Sullivan KA, Feldman EL. 1999. Insulin-like growth factor-I and central nervous system development. *Horm Metab Res*, 31(2-3):120-125.
8. **Antonow-Schlorke I**, Ebert M, Li C, Gschanes A, Witte OW, McDonald T, Nathanielsz PW, Schwab M. 2007. Lack of effect of antenatal glucocorticoid therapy in the fetal baboon on cerebral cortical glucose transporter proteins. *J Med Primatol*, 36(1):17-20.
9. **Antonow-Schlorke I**, Ebert M, Muller T, Schubert H, Gschanes A, Witte OW, Nathanielsz PW, Schwab M. 2006. Glucose transporter proteins GLUT1 and GLUT3 like immunoreactivities in the fetal sheep brain are not reduced by maternal betamethasone treatment. *Neurosci Lett*, 403(3):261-265.

10. **Antonow-Schlorke I**, Helgert A, Gey C, Coksaygen T, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M. 2008. Adverse effects of antenatal glucocorticoids on cerebral myelination are dose dependent and specific to the fetal stage of development. *Obstet Gynecol*, in press.
11. **Antonow-Schlorke I**, Schwab M, Li C, Nathanielsz PW. 2003. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J Physiol*, 547(Pt 1):117-123.
12. **Arnold SE**, Trojanowski JQ. 1996. Human fetal hippocampal development: II. The neuronal cytoskeleton. *J Comp Neurol*, 367(2):293-307.
13. **Barkovich AJ**, Kjos BO, Jackson DE, Norman D. 1988. Normal maturation of the neonatal and infant brain: MR imaging at 1.5 T. *Radiology*, 166(1 Pt 1):173-180.
14. **Barreto-Medeiros JM**, Feitoza EG, Magalhaes K, Cabral-Filho JE, Manhaes-De-Castro FM, De-Castro CM, Manhaes-De-Castro R. 2004. Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. *Nutr Neurosci*, 7(1):49-52.
15. **Baumann N**, Pham-Dinh D. 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, 81(2):871-927.
16. **Benediktsson R**, Calder AA, Edwards CR, Seckl JR. 1997. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 46(2):161-166.
17. **Ben-Hur T**, Rogister B, Murray K, Rougon G, Dubois-Dalcq M. 1998. Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain. *J Neurosci*, 18(15):5777-5788.
18. **Bershadsky AD**, Vasiliev JM. 1989. Cytoskeleton. New York: Plenum Press.
19. **Böck P**, Zschiesche B. 1978. Phosphotungstic acid/Levanol (PTA/Levanol) staining of myelin in brain. *Acta Neuropathol (Berl)*, 42(2):135-136.
20. **Bondy CA**, Lee W, Zhou J. 1992. Ontogeny and cellular distribution of brain Glukose transporter gene expression. *Mol Cell Neurosci*, 3:305-314.
21. **Bradley RH**, Corwyn RF. 2002. Socioeconomic status and child development. *Annu Rev Psychol*, 53:371-399.

22. **Brandt I.** 1981. Brain growth, fetal malnutrition and clinical consequences. *J Perinat Med*, 9(1):3-26.
23. **Brodhun M**, Coksaygan T, Müller T, Antonow-Schlorke I, Schubert H, Patt S, Nathanielsz PW, Schwab M. 2004b. Time and dose dependent effects of antenatal glucocorticoids on cell birth and death in the fetal sheep brain. *J Soc Gynecol Invest*, 11(Suppl.):533.
24. **Brodhun M**, Coksaygen T, Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Patt S, Nathanielsz PW, Schwab M. 2003. Association of programmed cell death and glucocorticoid receptors during brain development in fetal sheep. *J Soc Gynecol Invest*, 10(Suppl.):765.
25. **Brodhun M**, Müller T, Coksaygen T, Antonow-Schlorke I, Schubert H, Patt S, Nathanielsz PW, Schwab M. 2004a. Neurogenesis and programmed cell death during development of the fetal sheep brain. *J Soc Gynecol Invest*, 11(Suppl.):532.
26. **Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung.** Hrsg. 2003. Aktionsprogramm 2015. Armut bekämpfen. Gemeinsam handeln. Der Beitrag der Bundesregierung zur weltweiten Halbierung extremer Armut. Zweite Aufl. Bonn: Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung.
27. **Burette A**, Jalenques I, Romand R. 1998. Developmental distribution of astrocytic proteins in the rat cochlear nucleus. *Brain Res Dev Brain Res*, 107(2):179-189.
28. **Caviness VS Jr.** 1973. Time of neuron origin in the hippocampus and dentate gyrus of normal and reeler mutant mice: an autoradiographic analysis. *J Comp Neurol*, 151(2):113-120.
29. **Caviness VS Jr**, Takahashi T, Nowakowski RS. 1995. Numbers, time and neocortical neuronogenesis: a general developmental and evolutionary model. *Trends Neurosci*, 18(9):379-383.
30. **Cheek DB**, Holt AB, London WT, Ellenberg JH, Hill DE, Sever JL. 1976. Nutritional studies in the pregnant rhesus monkey – the effect of protein-calorie or protein deprivation on growth of the fetal brain. *Am J Clin Nutr*, 29(10):1149-1157.

31. **Chen LC**, Scimshaw NS. 1983 Diarrhea and malnutrition: interactions, mechanisms, and interventions. New York: United Nations University Press.
32. **Chowen J**, Goya L, Ramos S, Busiguina S, Garcia-Segura LM, Argente J, Pascual-Leone AM. 2002. Effects of early undernutrition on the brain insulin-like growth factor-I system. *J Neuroendocrinol*, 14(2):163-169.
33. **Clancy B**, Darlington RB, Finlay BL. 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*, 105(1):7-17.
34. **Cohen P**, Fielder PJ, Hasegawa Y, Frisch H, Giudice LC, Rosenfeld RG. 1991. Clinical aspects of insulin-like growth factor binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 124(2):74-85.
35. **Cornford EM**, Hyman S, Cornford ME, Damian RT, Raleigh MJ. 1998. A single glucose transporter configuration in normal primates brain endothelium: comparison with resected human brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57(7):699-713.
36. **Couillard-Despres S**, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn H-G, Aigner L. 2005. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Europ J Neurosci*, 21(1):1-14.
37. **Dayer AG**, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. 2005. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol*, 168(3):415-427.
38. **Delisle H**. 2002. Foetal programming of nutrition-related chronic diseases. *Sante*, 12(1):56-63.
39. **D'Ercole AJ**, Ye P, Calikoglu AS, Gutierrez- Ospina G. 1996. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol*, 13(3):227-55.
40. **Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung**. 2000. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Erste Auflage. Frankfurt/M: Umschau Braus.
41. **Diaz JR**, de las Cagigas A, Rodriguez R. 2003. Micronutrient deficiencies in developing and affluent countries. *Eur J Clin Nutr*, 57(1):70-72.

42. **Dick APK**, Harik SI, Klip A, Walker DM. 1984. Identification and characterization of the Glukose transporter of the blood-brain barrier by cytochalasin B binding and immunological reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(22):7233-7237.
43. **Dieni S**, Inder T, Yoder B, Briscoe T, Camm E, Egan G, Denton D, Rees S. 2004. The pattern of cerebral injury in a primate model of preterm birth and neonatal intensive care. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63(12):1297-1309.
44. **Distelhorst CW**. 1997. Glucocorticoid-induced apoptosis. *Adv Pharmacol*, 41:247-270.
45. **Dobbing J**, Sands J. 1978. Head circumference, biparietal diameter and brain growth in fetal and postnatal life. *Early Hum Dev*, 2(1):81-87.
46. **Edwards LJ**, Coulter CL, Symonds ME, McMillen IC. 2001. Prenatal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28(11):938-941.
47. **Falini B**, Flenghi L, Fagioli M, Stein H, Schwarting R, Riccardi C, Manocchio I, Pileri S, Pelicci PG, Lanfranccone L. 1989. Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem*, 37(10):1471-1478.
48. **Ferreira A**, Busciglio J, Caceres A. 1989. Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and Tau. *Brain Res Dev Brain Res*, 49(2):215-228.
49. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2004. The State of Food Insecurity in the World (SOFI) 2004. Erste Aufl. Rom: FAO.
50. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 1985. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. World Health Organization Technical Report Series, 724:1-206.
51. **Fowden AL**. 2003. The insulin-like growth factors and fetoplacental growth. *Placenta*, 24(8-9):803-812.
52. **French NP**, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP. 1999. Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol*, 180(1 Pt 1):114-121.

53. **Fujimori K**, Takauji R, Tamamaki N. 2002. Differential localization of high- and low-molecular-weight variants of microtubule-associated protein 2 in the developing rat telencephalon. *J Comp Neurol*, 449(4):330-342.
54. **Fuller GN**, Johnston DA, Wiggins RC. 1984. The relationship between nutritional adequacy and brain myelin accumulation: a comparison of varying degrees of well fed and undernourished rats. *Brain Research*, 290(1):195-198.
55. **Fuller GN**, Wiggins RC. 1984. Differential growth recovery within brains of postnatally undernourished rats. *Brain Res*, 317(2):280-282.
56. **Galler JR**, Ramsey F, Solimano G, Kucharski LT, Harrison R. 1984. The influence of early malnutrition on subsequent behavioral development. IV. Soft neurologic signs. *Pediatr Res*, 18(9):826-832.
57. **Garcion E**, Faissner A, French-Constant C. 2001. Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development*, 128(13):2485-2496.
58. **Gavrieli Y**, Sherman Y, Ben-Sasson S.A. 1992. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *J Cell Biol*, 119(3):493-501.
59. **Gerdes J**, Dallenbach F, Lennert K, Lemke H, Stein H. 1984a. Growth fraction in malignant lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol*, 2(4):365-371.
60. **Gerdes J**, Lellé RJ, Pickartz H, Heidenreich H, Schwarting R, Kurtsiefer L, Stauch G, Stein H. 1986. Growth fraction in human breast cancers as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *J Clin Pathol*, 39(9):977-980.
61. **Gerdes J**, Schwab U, Lemke H, Baisch H, Wasker HH, Schwab U, Stein H. 1984b. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133(4):1710-1715.
62. **Gerhart DZ**, LeVasseur RJ, Broderius MA, Drewes LR. 1989. Glukose transport localization in brain using light and electron immunocytochemistry. *J Neurosci Res*, 22(4):464-472.
63. **Giangaspero F**, Doglioni C, Rivano MT, Pileri S, Gerdes J, Stein H. 1987. Growth fraction in human brain tumors defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Acta Neuropathol*, 74(2):179-182.
64. **Gibbons A**. 1998. Solving the brain's energy crisis. *Science*, 280(5368):1345-1347.

65. **Giudice LC**, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin Ba, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL, Rosenfeld RG. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term an preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(5):1548-1555.
66. **Gluckman PD**, Harding JE. 1997. Fetal growth retardation: underlying endocrine mechanisms and postnatal consequences. *Acta Paediatr Suppl*, 422:69-72.
67. **Gordon- Weeks PR**. 1997. MAPs in growth cones. *Brain Microtubule Associated Proteins. Modifications in Disease*, Sydney: Harwood Academic Publishers, 53-77.
68. **Gould E**, Cameron HA. 1996. Regulation of neuronal birth, migration and death in the rat dentate gyrus. *Dev Neurosci*, 18(1-2):22-35.
69. **Gould E**, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6):3168-3171.
70. **Gould E**, Woolley CS, Cameron HA, Daniels DC, McEwen BS. 1991b. Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: II. Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on cell birth. *J Comp Neurol*, 313(3):486-493.
71. **Gould E**, Woolley CS, McEwen BS. 1991a. Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *J Comp Neurol*, 313(3):479-485.
72. **Graubner B**. 2007. ICD-10-GM 2008 Systematisches Verzeichnis: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme. Erste Auflage. Köln: Deutscher Ärzte- Verlag.
73. **Gressens P**, Muaku SM, Besse L, Nsegbe E, Gallego J, Delpech B, Gaultier C, Evrard P, Ketelslegers JM, Maiter D. 1997. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Dev Brain Res*, 103(1):21-35.
74. **Hack M**, Flannery DJ, Schluchter M, Cartar L, Borawski E, Klein N. 2002. Outcomes in young adulthood for very-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*, 346(3):149-157.
75. **Hagberg G**, Hagberg B, Olow I. 1976. The changing panorama of cerebral palsy in Sweden 1954-1970. III. The importance of foetal deprivation of supply. *Acta Paediatr Scand*, 65(4):403-408.

76. **Haglid KG**, Yang Q, Hamberger A, Bergman S, Widerberg A, Danielsen N. 1997. S-100beta stimulates neurite outgrowth in the rat sciatic nerve grafted with acellular muscle transplants. *Brain Res*, 753(2):196-201.
77. **Hassan AH**, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF. 1996. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol*, 140(1):43-52.
78. **Hillman NM**, Fuselier PH, Riopelle AJ. 1974. Protein deprivation in primates. II. Effects of fondling on feeding behavior of discomforted infant rhesus monkeys. *Dev Psychobiol*, 7(4):369-374.
79. **Hillman NM**, Khalid SR, Riopelle AJ. 1978. Protein deprivation in primates. X. Test performance of juveniles born of deprived mothers. *Am J Clin Nutr*, 31(3):388-393.
80. **Hillman NM**, Riopelle AJ. 1977. Protein deprivation in primates: XII. food preferences of juvenile rhesus monkeys. *Percept Mot Skills*, 45(1):3-10.
81. **Hendrickx AG**, Peterson PE. 1997. Perspectives on the use of the baboon in embryology and teratology research. *Hum Reprod Update*, 3(6):575-592.
82. **Huizink AC**, Robles de Medina PG, Mulder EJ, Visser GH, Buitelaar JK. 2003. Stress during pregnancy is associated with developmental outcome in infancy. *J Child Psychol Psychiatry*, 44(6):810-818.
83. **Johe KK**, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD. 1996. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev*, 10(24):3129-3140.
84. **Jones FS**, Jones PL. 2000. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodelling. *Dev Dyn*, 218(2):235-259.
85. **Johnson GV**, Jope RS. 1992. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in neuronal growth, plasticity and degeneration. *J Neurosci Res*, 33(4):505-512.
86. **Joos KM**, Mawn LA, Shen JH, Casagrande VA. 2003. Chronic and acute analysis of optic nerve sheath fenestration with the free electron laser in monkeys. *Lasers Surg Med*, 32(1):32-41.

87. **Kanitz E**, Otten W, Tuchscherer M, Manteuffel G. 2003. Effects of prenatal stress on corticosteroid receptors and monoamine concentrations in limbic areas of suckling piglets (*Sus scrofa*) at different ages. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 50(3):132-139.
88. **Kerr GR**, Allen JR, Scheffler G, Waisman HA. 1970. Malnutrition studies in the rhesus monkey. I. Effect on physical growth. *Am J Clin Nutr*, 23(6):739-748.
89. **Klingberg T**, Vaidya CJ, Gabrieli JDE, Moseley ME, Hedehus M. 1999. Myelination and organization of the frontal white matter in children: a diffusion tensor MRI study. *Neuro Report*, 10(13):2817-2821.
90. **Kuo HC**, Pau KY, Yeoman RR, Mitalipov SM, Okano H, Wolf DP. 2003. Differentiation of monkey embryonic stem cells into neural lineages. *Biol Reprod*, 68(5):1727-1735.
91. **Kwong WY**, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. 2000. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*, 127(19):4195-4202.
92. **Langley-Evans SC**, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, Seckl JR. 1996. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta*, 17(2-3):169-172.
93. **Lesage J**, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. 2001. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology*, 142(5):1692-1702.
94. **Li J**, Saunders JC, Gilmour RS, Silver M, Fowden AL. 1993. Insulin-like growth factor-II messenger ribonucleic acid expression in fetal tissues of the sheep during late gestation: effects of cortisol. *Endocrinology*, 132(5):2083-2089.
95. **Lister JP**, Blatt GJ, DeBassio WA, Kemper TL, Tonkiss J, Galler JR, Rosene DL. 2005. Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation. *Hippocampus*, 15(3):393-403.
96. **Maher F**, Vannucci SJ, Takeda J, Simpson IA. 1992. Expression of mouse-GLUT3 and human-GLUT3 glucose transporter proteins in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 182(2):703-711.

97. **Maher F**, Vannucci SJ, Simpson IA. 1993. Glucose transporter isoforms in brain: Absence of GLUT3 from the blood brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, 13(2):342-345.
98. **Maher F**, Vannucci SJ, Simpson IA. 1994. Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J*, 8(13):1003-1011.
99. **Matthews SG**. 2002. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab*, 13(9):373-380.
100. **Matus A**. 1990. Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J Physiol (Paris)*, 84(1):134-137.
101. **Matte TD**, Bresnahan M, Begg MD, Susser E. 2001. Influence of variation in birth weight within normal range and within sibships on IQ at age 7 years: cohort study. *BMJ*, 323(7308):310-314.
102. **McDonald TJ**, Li C, Nijland M, Schlabritz-Loutsevitch N, Nathanielsz PW. 2006. Contrasting effects of 30% maternal nutrient restriction from 30 to 90 and 30 to 165 days of gestation on baboon fetal and placental parameters. *J Soc Gynecol Invest*, 13(Suppl.):81.
103. **McMillen IC**, Robinson JS. 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*, 85(2):571-633.
104. **Modi N**, Lewis H, Al-Naqeeb N, Ajayi-Obe M, Dore CJ, Rutherford M. 2001. The effects of repeated antenatal glucocorticoid therapy on the developing brain. *Pediatr Res*, 50(5):581-585.
105. **Morgane PJ**, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR. 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev*, 17(1):91-128.
106. **Morgane PJ**, Mokler DJ, Galler JR. 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*, 26(4):471-483.
107. **Müller O**, Krawinkel M. 2005. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ*, 173(3):279-286.
108. **Namihira M**, Nakashima K, Taga T. 2004. Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in an immature astrocyte specific gene promoter. *FEBS Lett*, 572(1-2):184-188.

109. **Niblock MM**, Brunso-Bechtold JK, Riddle DR. 2000. Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J Neurosci*, 20(11):4165-4176.
110. **Nualart F**, Godoy A, Reinicke K. 1999. Expression of the hexose transporters GLUT1 and GLUT2 during the early development of the human brain. *Brain Res*, 824(1):97-104.
111. **Nyirenda MJ**, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR. 1998. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest*, 101(10):2174-2181.
112. **Olness K**. 2003. Effects on brain development leading to cognitive impairment: a worldwide epidemic. *J Dev Behav Pediatr*, 24(2):120-130.
113. **Oppenheim RW**. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 14:453-501.
114. **O'Kusky JR**, Ye P, D'Ercole AJ. 2000. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J Neurosci*, 20(22):8435-8442.
115. **Pardridge WM**, Boado RJ, Farrell CR. 1990. Brain- type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. *J Biol Chem*, 265(29):18035-18040.
116. **Pollitt E**. 2000. Developmental sequel from early nutritional deficiencies: conclusive and probability judgements. *J Nutr*, 130(2S Suppl.):350S-353S.
117. **Price WA**, Stiles AD, Moats-Staats BM, D'Ercole AJ. 1992. Gene expression of insulin-like growth factors (IGFs), the type 1 IGF receptor, and IGF-binding proteins in dexamethasone-induced fetal growth retardation. *Endocrinology*, 130(3):1424-1432.
118. **Rajan P**, McKay RD. 1998. Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci*, 18(10):3620-3629.
119. **Rakic P**. 1971. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res*, 33(2):471-476.

120. **Rakic P.** 2003. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cerebral Cortex*, 13(6):541-549.
121. **Rakic P.** 1978. Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. *Postgrad Med J*, 54(Suppl.1):25-40.
122. **Rakic S, Zecevic N.** 2001. Programmed cell death in the developing human telencephalon. *Eur J Neurosci*, 12(8):2721-2734.
123. **Rees S, Bocking AD, Harding R.** 1988. Structure of the fetal sheep brain in experimental growth retardation. *J Dev Physiol*, 10(3):211-225.
124. **Rees S, Harding R.** 2004. Brain development during fetal life: influences of the intra-uterine environment. *Neurosci Lett*, 361(1-3):111-114.
125. **Reiner O, Coquelle FM, Peter B, Levy T, Kaplan A, Sapir T, Orr I, Barkai N, Eichele G, Bergmann S.** 2006. The evolving doublecortin (DCX) superfamily. *BMC Genomics*, 7:188.
126. **Resnick O, Miller M, Forbes W, Hall R, Kemper T, Brozino J, Morgane PJ.** 1979. Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci Biobehav Rev*, 3(4):233-246.
127. **Riederer B, Matus A.** 1985. Differential expression of distinct microtubule-associated proteins during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(17):6006-6009.
128. **Richards M, Hardy R, Kuh D, Wadsworth ME.** 2002. Birthweight, postnatal growth and cognitive function in a national UK birth cohort. *Int J Epidemiol*, 31(2):342-348.
129. **Riopelle AJ, Favret R.** 1977. Protein deprivation in primates: XIII. Growth of infants born of deprived mothers. *Hum Biol*, 49(3):321-333.
130. **Riopelle AJ, Hill CW, Li SC.** 1975. Protein deprivation in primates. V. Fetal mortality and neonatal status of infant monkeys born of deprived mothers. *Am J Clin Nutr*, 28(9):989-993.
131. **Rosenfeld P, van Eekelen JA, Levine S, de Kloet ER.** 1993. Ontogeny of corticosteroid receptors in the brain. *Cell Mol Neurobiol*, 13(4):295-319.

132. **Royland J**, Klinkhachorn P, Konat G, Wiggins RC. 1992. How much undernourishment is required to retard brain myelin development. *Neurochem Int*, 21(2):269-274.
133. **Sackey FN**, Hache RJ, Reich T, Kwast-Welfeld J, Lefebvre YA. 1996. Determinants of subcellular distribution of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*, 10(10):1191-1205.
134. **Sánchez MM**, Young LJ, Plotsky PM, Insel TR. 2000. Distribution of corticosteroid receptors in the rhesus brain: relative absence of glucocorticoid receptors in the hippocampal formation. *J Neurosci*, 20(12):4657-4668.
135. **Sarnat HB**, Nochlin D, Born DE. 1998. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system. *Brain Dev*, 20(2):88-94.
136. **Saugstad LF**. 2004. From superior adaptation and function to brain dysfunction--the neglect of epigenetic factors. *Nutr Health*, 18(1):3-27.
137. **Sawaya AL**, Martins PA, Grillo LP, Florencio TT. 2004. Long-term effects of early malnutrition on body weight regulation. *Nutr Rev*, 62(7 Pt 2):S127-133.
138. **Schlabritz-Loutsevitch NE**, Howell K, Rice K, Glover EJ, Nevill CH, Jenkins SL, Bill Cummins L, Frost PA, McDonald TJ, Nathanielsz PW. 2004a. Development of a system for individual feeding of baboons maintained in an outdoor group social environment. *J Med Primatol*, 33(3):117-126.
139. **Schlabritz-Loutsevitch NE**, Hubbard GB, Dammann MJ, Jenkins SL, Frost PA, McDonald TJ, Nathanielsz PW. 2004b. Normal concentrations of essential and toxic elements in pregnant baboons and fetuses (*Papio* species). *J Med Primatol*, 33(3):152-162.
140. **Schneider D**. 2000. International trends in adolescent nutrition. *Soc Sci Med*, 51(6):955-967.
141. **Schwab M**. 2007. Fetal brain development and the programming of cerebral disorders. *Der Gynäkologe* 40:256-263.

142. **Schwab M**, Antonow-Schlorke I, Schlabritz-Loutsevitch N, Stuchlik K, Levitz M, Cox L, McDonald TJ, Witte OW, Nathanielsz PW. 2005. Development of the cortical neuronal network in fetal baboons at 0.5 of gestation is altered by 30% maternal nutrient restriction. *Ped Res*, 58:1115.
143. **Seckl JR**. 1998. Physiologic programming of the fetus. *Clin Perinatol*, 25(4):939-962.
144. **Seidman DS**, Laor A, Gale R, Stevenson DK, Mashlach S, Danon YL. 1992. Birth weight and intellectual performance in late adolescence. *Obstet Gynecol*, 79(4):543-546.
145. **Sevier AC**, Munger BL. 1965. A silver method for paraffin sections of neural tissue. *J Neuropathol Exp Neurol*, 24:130-135.
146. **Sidman RL**, Rakic P. 1973. Neuronal migration, with special reference to developing human: a review. *Brain Res*, 62(1):1-35.
147. **Sorensen HT**, Sabroe S, Olsen J, Rothman KJ, Gillman MW, Fischer P. 1997. Birth weight and cognitive function in young adult life: historical cohort study. *BMJ*, 315(7105):401-403.
148. **Staudt M**, Krägeloh-Mann I, Grodd W. 2000. Die normale Myelinisierung des kindlichen Gehirns in der MRT – eine Metaanalyse. *Fortschr Röntgenstr*, 172:802-811.
149. **Steiger JL**, Alexander MJ, Galler JR, Farb DH, Russek SJ. 2003. Effects of prenatal malnutrition on GABAA receptor alpha1, alpha3 and beta2 mRNA levels. *Neuroreport*, 14(13):1731-1735.
150. **Takahashi LK**. 1998. Prenatal stress: consequences of glucocorticoids on hippocampal development and function. *Int J Dev Neurosci*, 16(3-4):199-207.
151. **Tame JD**, Winter JA, Li C, Jenkins S, Giussani DA, Nathanielsz PW. 1998. Fetal growth in the baboon during the second half of pregnancy. *J Med Primatol*, 27(5):234-239.
152. **Tauber SC**, Schlumbohm C, Schilg L, Fuchs E, Nau R, Gerber J. 2006. Intrauterine exposure to dexamethasone impairs proliferation but not neuronal differentiation in the dentate gyrus of newborn common marmoset monkeys. *Brain Pathol*, 16(3):209-217.

153. **Temple S.** 2001. The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859):112-117.
154. **Thiessen JP**, Ketelslegers JM, Underwood LE. 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev*, 15(1):80-101.
155. **Trepel M.** Hrsg. 1999. *Neuronanatomie, Struktur und Funktion*. Zweite Aufl. München, Jena: Urban und Fischer Verlag.
156. **Tucker RP.** 1990. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Reviews*, 15(2):101-120.
157. **Tucker RP**, Binder LI, Matus AI. 1988. Neuronal microtubule-associated proteins in the embryonic avian spinal cord. *J Comp Neurol*, 27(1):44-55.
158. **Ueda S**, Gu XF, Whitaker-Azmitia PM, Naruse I, Azmitia EC. 1994. Neuro-glial neurotrophic interaction in the S-100 beta retarded mutant mouse (Polydactyly Nagoya). I. Immunocytochemical and neurochemical studies. *Brain Res*, 633(1-2):275-283.
159. **Ueda S**, Saitoh Y, Koibuchi N, Ishizuya-Oka A. 1997. Local disturbance of neuronal migration in the S-100beta-retarded mutant mouse. *Cell Tissue Res*, 289(3):547-551.
160. **Udani PM.** 1992. Protein energy malnutrition (PEM), brain and various facets of child development. *Indian J Pediatr*, 59(2):165-186.
161. **United Nations International Children´s Emergency Found.** 2001. *State of the world´s children 2001*. New York: Oxford University Press.
162. **United Nations International Children´s Emergency Found.** 2005. *State of the world´s children 2005*. New York: Oxford University Press.
163. **Valadares CT**, de Sousa Almeida S. 2005. Early protein malnutrition changes learning and memory in spaced but not in condensed trials in the Morris water-maze. *Nutr Neurosci*, 8(1):39-47.
164. **Vanderbilt JN**, Miesfeld R, Maler BA, Yamamoto KR. 1987. Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity. *Mol Endocrinol*, 1(1):68-74.

165. **Van Eldik LJ**, Wainwright MS. 2003. The janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restorative Neurol Neurosci*, 21(3-4):97-108.
166. **Vannucci RC**, Vannucci SJ. 2000. Glucose metabolism in the developing brain. *Semin Perinatol*, 24(2):107-115.
167. **Vannucci SJ**. 1994. Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. *J Neurochem*, 62(1):240-246.
168. **Vannucci SJ**, Seaman LB, Vannucci R. 1996. Effects of Hypoxia-Ischemia on GLUT1 and GLUT3 Glucosetransporters in Immature Rat Brain. *J Cereb Blood Flow*, 16(1):77-81.
169. **Vannucci SJ**, Simpson IA. 2003. Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285(5):E1127-1134.
170. **Viereck C**, Tucker RP, Binder LI, Matus A. 1988. Phylogenetic conservation of brain microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Neuroscience*, 26(3):893-904.
171. **Wadhwa PD**, Sandman CA, Garite TJ. 2001. The neurobiology of stress in human pregnancy: implications for prematurity and development of the fetal central nervous system. *Prog Brain Res*, 133:131-142.
172. **Wang Q**, Blackford JA Jr, Song LN, Huang Y, Cho S, Simons SS Jr. 2004. Equilibrium interactions of corepressors and coactivators with agonist and antagonist complexes of glucocorticoid receptors. *Mol Endocrinol*, 18(6):1376-1395.
173. **Weinstock M**. 1997. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci Biobehav Rev*, 21(1):1-10.
174. **Welberg LA**, Seckl JR. 2001. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol*, 13(2):113-128.

175. **Whorwood CB**, Firth KM, Budge H, Symonds ME. 2001. Maternal undernutrition during early to midgestation programs tissue-specific alterations in the expression of the glucocorticoid receptor, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms, and type 1 angiotensin ii receptor in neonatal sheep. *Endocrinology*, 142(7):2854-2864.
176. **Wiggins RC**. 1986. Myelination: a critical stage in development. *Neurotoxicology*, 7(2):103-120.
177. **Wiggins RC**. 1982. Myelin development and nutritional insufficiency. *Brain Res*, 257(2):151-175.
178. **Wiggins RC**, Fuller G, Enna SJ. 1984a. Undernutrition and the development of brain neurotransmitter systems. *Life Sci*, 35(21):2085-2094.
179. **Wiggins RC**, Fuller GN, Brizzee L, Bissel AC, Samorajski T. 1984b. Myelination of the Rat Optic Nerve During Postnatal Undernourishment and Recovery: a Morphometric Analysis. *Brain Research*, 308(2):263-272.
180. **Williamson CS**. 2006. Nutrition in pregnancy. *Nutrition Bulletin*, 31(1):28-59.
181. **Wilson KE**, Bartlett JM, Miller EP, Smyth JF, Mullen P, Miller WR, Langdon SP. 1999. Regulation and function of the extracellular matrix protein tenascin-C in ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer*, 80(5-6):685-692.
182. **Winick M**. 1976. *Malnutrition and Development*. New York: Oxford University Press.
183. **Winick M**, Rosso P. 1969. The effect of severe early malnutrition on cellular growth of human brain. *Pediatr Res*, 3(2):181-184.
184. **World Health Organisation**. 2002. *Food and health in Europe: A new basis for action*. Summary. Kopenhagen: WHO.
185. **Wüst S**, Entringer S, Federenko IS, Schlotz W, Hellhammer DH. 2005. Birth weight is associated with salivary cortisol responses to psychosocial stress in adult life. *Psychoneuroendocrinology*, 30(6):591-598.
186. **Wyszomierski SL**, Yeh J, Rosen JM. 1999. Glucocorticoid receptor/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) interactions enhance STAT5 activation by prolonging STAT5 DNA binding and tyrosine phosphorylation. *Mol Endocrinol*, 13(2):330-343.

187. **Yang K**, Jones SA, Challis JR. 1990. Changes in glucocorticoid receptor number in the hypothalamus and pituitary of the sheep fetus with gestational age and after adrenocorticotropin treatment. *Endocrinology*, 126(1):11-17.
188. **Ye P**, Lee KH, D'Ercole AJ. 2000. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) protects myelination from undernutritional insult: studies of transgenic mice overexpressing IGF-I in brain. *J Neurosci Res*, 62(5):700-708.
189. **Zetkin M**, Schaldach H. 1992. Wörterbuch der Medizin. 15. Aufl. Berlin: Ullstein Mosby Verlag.

9. Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Kristina Stuchlik
Anschrift: Kesselgasse 9; 04600 Altenburg
Geburtsdatum: 07.04.1983
Geburtsort: Zeitz
Familienstand: ledig

Schulbildung:

Sep. 1989 – Juli 1993 Grundschole, Altenburg
Sep. 1993 – Juni 2001 Lerchenberggymnasium, Altenburg; Abschluss: Abitur

Hochschulstudium und wiss. Tätigkeiten:

Okt. 2001 – Nov. 2007 Studentin der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Juni 2005 2. Platz beim „Tag der Nachwuchswissenschaftler“ am Forschungszentrum Lobeda in Jena.

Veröffentlichung:

Schwab M, Antonow-Schlorke I, Schlabritz-Loutsevitch N, Stuchlik K, Levitz M, Cox L, McDonald TJ, Witte OW, Nathanielsz PW. 2005. Development of the cortical neuronal network in fetal baboons at 0.5 of gestation is altered by 30% maternal nutrient restriction. Ped Res, 58:1115.

Famulaturen:

Feb. 2004 – März 2004 Kreiskrankenhaus Altenburg (Pädiatrie)
Feb. 2005 – März 2005 St. Josefskrankenhaus Heidelberg (Innere Medizin)
Juli 2005 – Aug. 2005 Wodonga Hospital, Australien (Notfallmedizin)
Feb.2006 – März 2006 Städtisches Klinikum Fulda (Pädiatrie)

Praktisches Jahr:

Aug.2006 – Dez. 2006 Felix-Platter-Spital Basel, Schweiz (Innere Medizin)
Dez. 2006 – März 2007 Kreiskrankenhaus Altenburg (Pädiatrie)
April 2007 – Juli 2007 Friedrich- Schiller Universität Jena (Chirurgie)

Beruflicher Werdegang:

Seit Jan. 2008 Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin; Klinikum Altenburg

Jena, den 12.10.2009

Kristina Stuchlik

9.2. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Kristina Stuchlik, geboren am 07.04.1983 in Zeitz, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. M. Schwab und Dipl. biol. I. Antonow-Schlorke,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 12.10.2009

Kristina Stuchlik

9.3. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben, herzlich bedanken. Insbesondere gilt mein Dank:

Herrn PD Dr. med. M. Schwab für die ausgesprochen freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe „Fetale Hirnentwicklung und Programmierung von Erkrankungen im späteren Leben“, die Überlassung des vielseitigen und anspruchsvollen Themas, die ständige Gesprächsbereitschaft und die zahlreichen konstruktiven Vorschläge bei der Anfertigung der Dissertationsschrift.

Frau Dipl. biol. I. Antonow-Schlorke für ihre ausgezeichnete und herzliche Betreuung, ihre besondere Hilfsbereitschaft und Geduld und die exzellente Anleitung, sowohl bei den Experimenten, als auch bei der Auswertung der Ergebnisse und dem Verfassen der Arbeit.

Frau Dr. H. Hoyer für die freundliche und kompetente Unterstützung bei mathematischen Fragestellungen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Fetale Hirnentwicklung und Programmierung von Erkrankungen im späteren Leben“ und unserem Kooperationspartner, der Southwest Foundation of Biomedical Research in den USA, für die stets angenehme und freundliche Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meinem Freund Felix, sowie allen Freunden für ihre ständige Unterstützung und Motivation während der Experimente und der Anfertigung der Dissertationsschrift.